УДК 632.38:577.213/.216:635.82

Виявлення вірусних хвороб у плодових тілах печериці двоспорової (*Agaricus bisporus (J.Lge) lmbach)*

Т.В. Іванова, здобувач*

Вивчено вірусні хвороби печериці двоспорової (Agaricus bisporus) (J. Lge) Imbach). Запроваджено методику ідентифікації длРНК, виділених із симптомних та із безсимптомних плодових тіл печериці двоспорової.

Ключові слова: печериця двоспорова, вірус, хвороба, ідентифікація, длРНК, електронна мікроскопія.

Нині у світі вирощується близько 35 видів грибів, з них 20 у промислових масштабах. Більшість культивованих видів − їстівні, деякі мають лікувальні властивості. Серед них печериця двоспорова (*Agaricus bisporus) (J. Lge) Imbach*) є найрозповсюдженішою культивованою грибною культурою у світі, на частку якої припадає 35-45% від загального обсягу виробництва грибів. Великомасштабне виробництво печериці зосереджене в країнах західної Європи (в основному, Голландія і Франція), Північна Америка (США, Канада) і Південно-східна Азія (Китай, Корея, Індонезія, Тайвань та Індія) [11].

Останнім часом в Україні спостерігається збільшення обсягу виробництва культивованих їстівних грибів. Так, у 2009 р. було вироблено 40 тис. тонн грибів, що в 26 разів більше, ніж у 2000 році та майже в 2 рази більше, ніж наприклад, у Туреччині [19].

Через нестачу достовірної ринкової інформації і офіційних даних щодо обсягів виробництва грибів в Україні ці цифри умовні. За обсягами виробництва грибів кращими є Київська, Донецька, Дніпропетровська, Одеська,

* науковий керівник – М.Д. Мельничук, доктор біологічних наук, член-кореспондент НААН України, професор

Харківська і Львівська області, в господарствах яких вирощують печериці і гливи [11,19]. До найбільших підприємств в Україні, які вирощують свіжі гриби, належать: Київський науково-дослідний агрокомбінат "Пуща Водиця" (на його частку припадає майже 20 % загального обсягу вирощених грибів); ЗАТ "Укршампіньон" (м. Канів) – вирощує і консервує гриби; ЗАТ "Трикар-АПС" і ПП "Гуржій" (м. Харків); ВАТ "Гелена-М" (Одеська обл., с. Іллічівка); ВАТ "Квіти-Сервіс"; ВАТ "Грибник" (м. Київ); ВАТ "Валентина" (Київська обл., м. Васильків,); Агрофірма "Овочівник" (м. Мелітополь); ЗАТ "Комгрі" (м. Бровари) [4].

Нині вченими остаточно доведено, що практично кожній рослині (як і людині, тварині, грибу тощо) притаманні свої специфічні віруси [6]. Віруси було виділено у 73 видів грибів, що належать до 57 родів та п’яти класів. Більшість з них є відносно авірулентними. З метою класифікації вірусів грибів при Міжнародному комітеті з таксономії вірусів (МКТВ) було створено спеціальний комітет [20].

Останнім часом в результаті застосування спрощених методик діагностики захворювань печериці в господарствах, що їх вирощують, збільшилась кількість випадків виявлення вірусних хвороб і часто з першого дня культивування міцелію [2].

Впродовж останніх 20 років у літературі з'явилися роботи, присвячені вивченню вірусних захворювань печериці і заходів боротьби з ними [1-3,7-18]. Найнебезпечнішим серед них є La France (LFIV або LIV), яке в плодових тілах індукується віріоном розміром 35 нм. Цей ізометричний вірус був предметом широких епідеміологічних досліджень і боротьби, тому тепер захворювання La France зустрічається рідко [2,8,9-11].

У плодових тілах печериці українськими вченими виявлено один з вірусів A. Bisporus, який має паличкоподібну форму. Його довжина становить 150-295 нм, діаметр – майже 18 нм. Цей патоген знижував урожай грибів впродовж всього циклу збирання в 1,5-3 рази.

При застосуванні механічної інокуляції та ін'єкції суспензій з хворого

міцелію та плодових тіл, патоген може призвести до патологічних змін навіть у деяких рослин. У клітинах інокульованих рослин вірус локалізується в цитоплазмі і здатний утворювати внутрішньоклітинні включення. Встановлено, що він має антигенну спорідненість з вірусом тютюнової мозаїки [1,2,8].

Після виділення М. Холлінгсом сферичних (близько 25-29 нм) та бациловидних за морфологією вірусів (19х50 нм), з'явився ряд повідомлень про те, що печериці уражуються вірусами різної морфології. Умовно їх можна розділити на паличкоподібні, бациловидні та сферичні. При цьому паличкоподібний вірус, за даними майже всіх авторів, був розміром близько 270х 17 нм, бациловидний в основному – 19х50 нм, а сферичний – 25-45 нм. Цікаво, що бациловидний вірус за своєю морфологією схожий з вірусом мозаїки люцерни, але не має з ним серологічної спорідненості [2,15].

В умовах природних біоценозів та промислового виробництва грибів в Україні також виділені віруси розміром близько 32 нм, 18х52 нм та 150-295х 18 нм. Слід відзначити, що в деяких дослідженнях сферичним та бациловидним вірусами не вдавалося інфікувати вищі рослини [2,4,15].

В останні роки вірусні хвороби стали дуже поширеними при промисловому виробництві грибів. Восени 1996 р. в Англії повідомили про зниження врожаю грибів, причини якого не змогли встановити. Симптоми захворювання були відсутніми, але грибниці практично не мали ознак росту плодових тіл. З 1996 до 2003 року, число постраждалих господарств із подібною етіологією збільшилося. Кілька симптомів відповідали захворюванню на La France, але діагностичні тести для сферичного вірусу показували негативні результати. Останнім часом цю хворобу пов'язували з наявністю нових ізольованих дволанцюгових РНК (длРНК) елементів. Однак длРНК відрізнялись від раніше описаних в A.bisporus і від длРНК елементів, характерних для хвороби La France [9-11,13-15,17].

Було припущено, що цю хворобу індукував неописаний раніше вірус, із характерним длРНК геномом. Його назвали "virus X", а згодом Mushroom

Virus X (MVX) [8-10,13].

У 2010 р. кілька господарств Польщі з вирощування грибів, повідомили про незвичайні гриби коричневого кольору, що з'являються на плантаціях печеричних комплексів. Симптоми були дуже подібні до MVX, описаного ірландськими вченими [13,14].

Іноземні автори висловили думку, що побуріння грибів пов'язане не тільки з присутністю MVX, а могло бути спричинене абіотичними факторами. Існують відомості, що бактерія Pseudomonas також може призвести до таких "стрес-ефектів" із подібною зміною морфології [14].

Отже, вірусні хвороби не тільки знижують урожай печериць, а й призводять до повної загибелі міцелію. Доведено, що при вірусному захворюванні плодові тіла грибів змінюються морфологічно, втрачаючи при цьому свої смакові якості, мають зменшений термін зберігання і нерідко стають небезпечними для вживання [2,11].

Найбільша небезпека полягає в придбанні неякісного посівного матеріалу, контамінованого вірусами [2]. Такий вірусний міцелій росте повільніше здорового. Нині відомі вірусні хвороби печериць, які можуть уражати плодові тіла як в моновірозах, так і в різних комбінаціях (змішаних вірозах) [6]. Зовнішні симптоми, видимі неозброєним оком на плодових тілах, можуть бути найрізноманітнішими: коричневі довгасті плями на ніжках, водянисті ніжки, побуріння та всихання шапинок грибів. Деякі симптоми подібні до результатів недостатньої вентиляції або надмірної температури: маленькі шапинки на довгих ніжках, швидкий розрив тканин плодового тіла. Часто вірусні захворювання грибів протікають безсимптомно, призводячи до зменшення врожаю та якості грибів [1,2].

Метою нашого дослідження було розробити високоточні і ефективні діагностичні тест-системи для ідентифікації вірусів печериць, забезпечити експрес-діагностику і, як наслідок, високоточне планування закладки плантацій грибів на безвірусній основі. Це сприятиме своєчасності проведення заходів із запобігання та боротьби з вірусними інфекціями і

дозволить виробникам досягти високих результатів при вирощуванні грибів.

Матеріали і методи досліджень. Для дослідження вірусних патогенів грибів використовували зразки із специфічними симптомами і без них (табл.).

Виявлення вірусних хвороб печериць в Київській області

Зона дослідження (поширення) вірусних хвороб	Зовнішні симптоми ураження плодових тіл	Детекція вірусів методом виділення длРНК	Ураження, %, M± m
Київська обл., Васильківський р-н Приватне підприємство	Темно-коричневі плями, водянисті ніжки	+	8,5 ± 0,5
Київська обл., Києво-Святошинський р-н Приватне підприємство	Відсутні	+	7,0 ± 0,3
Київська обл., м. Васильків Приватне підприємство	Бурувато-темні плодові тіла	+	6,3 ± 0,3
Виробничий агрокомбінат м. Київ	Бурувато-коричневі плями	+	1,6 ± 0,6

При обстеженні плодових тіл печериці двоспорової в грибних господарствах Київської області Васильківського і Києво-Святошинського районів та промислових грибних підприємств міста Києва в період з листопада 2009 р. до вересня 2010 р. відібрали близько 180 зразків, і на 27 з яких, виявили симптоми, характерні для вірусних хвороб (рис.1,2).

Рис. 1 Побуріння та лізис плодових тіл печериць

Рис.2 Витягнутість ніжок печериці двоспорової

Для діагностики та ідентифікації невідомих вірусів застосовували метод електронної мікроскопії та зручний і апробований раніше метод виділення і ідентифікації длРНК, що вперше був запропонований ще в кінці 70-х років минулого століття [5,6]. Виділення длРНК з плодових тіл грибів проводили за раніше відомими методиками [6,9,13], з певними власними модифікаціями [6,13].

Для цього брали 3-10 г зразків плодових тіл печериць подрібнювали та гомогенізували масу із додаванням рідкого азоту у фарфорових ступках. Гомогенізовані зразки переносили в центрифужні пробірки, додавали 12 мл буфера 2х STE (H_2O – 500 мл, NaCl – 29г, tris – 30,5г, EDTA – 1,85г), 1 мл 1% SDS (H_2O – 100 мл, додицилосульфат натрію – 10 г) і 1мл бентоніту, перемішували на шейкері впродовж 15 хв до утворення однорідної маси. Додавали 17 мл STE-фенолу (H_2O – 500 мл, 2х STE – 500 мл, pH 4,5) та 17 мл розчину хлороформ-ізоамілу (24:1) й центрифугували 20 хв при 2500 об/хв. Після цього відібрали водну фазу і знову центрифугували 10 хв при 8000 об/хв [13], відібрали надосад і додавали 1,5 г целюлози, 3 мл абсолютного етанолу, перемішували впродовж 15-20 хв. Потім зразки переносили на лід на 30 хв при температурі мінус 15ºС. Вміст пробірок переливали в колонки, додавали буфер STE-OH (STE – 100 мл, етиловий спирт – 174 мл, H_2O – 726 мл) 20 мл та буфер STE – 20 мл. Фільтрати переливали в центрифужні пробірки та додавали 30 мл

етилового спирту, центрифугували 30 хв при 8000 об/хв [13], зливали надосад й підсушували на фільтрувальному папері при температурі плюс 18-20 ºС – 2 год, додавали 200 мкл 10Х РНК-буфера (0,35% (w/v) Orange G, 30% (w/v) Ficoll 400, 1 mM EDTA). В отриманий розчин додавали 1 мкл ДНКази в присутності 1 мкл $MgCl_2$ й переносили в термостат на 1 год при температурі плюс 37 ºС.

Електрофоретичне розділення нуклеїнових кислот длРНК проводили в 1% -вому агарозному гелі впродовж 30 хв при напрузі 5-15 В/см^2(рис. 3). Решту зразків зберігали при температурі мінус 20ºС.

Результати дослідження. Під час електрофоретичного розділення ідентифіковано длРНК-фрагмент розміром близько 6 тис. пар нуклеотидних залишків (пнз).

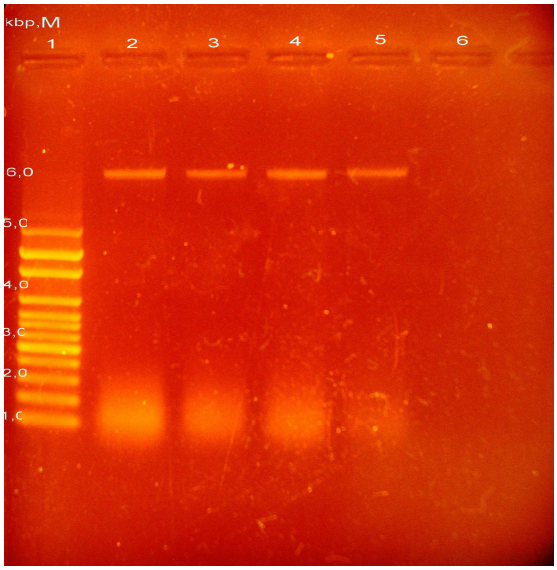

Рис. 3 Електрофореграма (трек 1 – ДНК-маркер (Ladder DNA marker (100-5000 bp)), треки 2-4 – зразки ізольованих длРНК з плодових тіл печериць, трек 5 – зразок ізольованої длРНК із безсимптомних плодових тіл печериць)

В результаті аналізу длРНК, виділених з плодових тіл печериці та електронної мікроскопії, встановлено наявність вірусної інфекції.

Присутність фрагментів длРНК вірусного походження збігається з літературними даними про можливість ураження грибів специфічними міковірусами із родини Rhabdoviridae. Можна стверджувати ефективність запроваджуваної методики ідентифікації длРНК виділених із симптомних та,

особливо, із безсимптомних плодових тіл печериці двоспорової. Після численних експериментів нами рекомендовано використовувати при аналізі кожного зразка 10 г грибної маси для екстракції длРНК. Отримані нами дані про присутність вірусних длРНК-фрагментів підтверджуються даними електронної мікроскопії (рис.4).

Електронно-мікроскопічне дослідження виділеного нативного матеріалу із кожного зразка здійснювали методом негативного контрастування при фіксації препарату 2%-вим розчином фосфорновольфрамової кислоти і переглядали на електронному трансмісійному мікроскопі ЭМВ-3А. Спостерігали тіла паличкоподібної форми розмірами ~70 нм (рис.4).

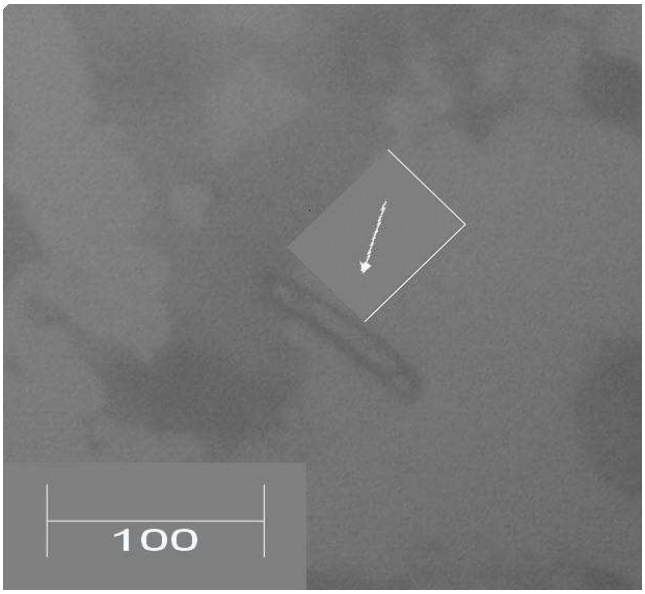

Рис.4 Електронографія паличкоподібного вірусу в печериці двоспоровій (Agaricus bisporus ((J. Lge) Imbach) Bar = 100 nm

Виявлені на плодових тілах печериці симптоми у вигляді побуріння та лізису плодових тіл, витягнутості ніжок (рис. 1, 2), дають змогу говорити про вірусну природу їх морфологічних деструкцій. Відмічено присутність длРНК вірусного походження і в безсимптомних зразках грибів.

Висновки

В результаті досліджень з плодових тіл печериці виділено длРНК. Дані електронної мікроскопії підтверджують наявність вірусної інфекції.

Виділені фрагменти длРНК узгоджуються з літературними даними про

ураження печериці специфічними міковірусами із родини Rhabdoviridae.

Рекомендації виробництву

В результаті проведених досліджень рекомендовано проводити обов'язковий контроль посадкового (маточного) матеріалу грибів (міцелію) на присутність вірусних патогенів. Це рекомендується і для безсимптомних грибів печериці двоспорової, яка в свою чергу може бути вражена вірусами в латентній (безсимптомній) формі. Останнє може стати прихованою причиною для виникнення змішаних інфекцій, коли при інфікуванні вірусом, грибні культури стають чутливими до хвороб, спричинених бактеріями та іншими патогенами, призводячи до втрат врожайності і якості продукції. Апробована система діагностики і ідентифікації длРНК фрагменту розміром близько 6 тис.пнс дозволяє проводити лабораторну експрес-діагностику на виявлення паличкоподібного вірусу печериці двоспорової (*Agaricus bisporus) (J. Lge) Imbach*).

Список літератури

1. Бойко О.А. Распространение, диагностика и профилактика болезней шампиньона двуспорового / Бойко О.А., Мельничук М.Д., Иванова Т.В. // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 2009. – №2. – С.23-24.
2. Бойко О.А. Экология и диагностика вирусных болезней шампиньонов / Бойко О.А. – К.: Фитосоциоцентр, 1999. – 24 с.
3. Девочкин Л.А. Шампиньоны / Л.А. Девочкин – М.: Колос, 1975.– 112 с.
4. Дубиніна А. Розвиток грибівництва в Україні / А. Дубиніна // Харчова і переробна промисловість. – 2009. – № 6-7. – С. 8-9.
5. Мельничук М.Д. Діагностика та ідентифікація РНК-вмісних фітовірусів на стадії їх біосинтезу шляхом вивчення фізико-хімічних властивостей вірусних дволанцюгових РНК / М.Д. Мельничук, Р.А. Валверді // Доп. НАН України. – 2001. – № 3. – с. 175-179.

6. Мельничук М.Д. Фітовірусологія / М.Д. Мельничук. Посібник. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. – 200 с.

7. Методические указания по иммунодиагностике и профилактике вирусных болезней шампиньона / [И.Б. Каплан, М.Э.Тальянский, К.Л. Алексеева и др.]. – М.:ВАСХНИЛ, 1986. – 22 с.

8. Воуко О. А. Diagnosis and prevention of virus — caused deseases of mushrooms in various ecological niches. / Воуко О. А. Тез. докл. 1-й Международной конференции. Донецк, 1-4 октября, 1997.– С.80-82.

9. Characterization of an RNA dependent RNA polymerase activity associated with La France isometric virus. J. / [Goodin M.M., Schlagnhaufer B., Weir T.,
Romaine C.P.] // Virol.– 1997.– №71.– P. 2264–2269.

10. Double-stranded RNA elements associated with the MVX disease of Agaricus bisporus / [Grogan H.M., Adie B.A., Gaze R.H. et al.] // Mycol. Res. – 2003.– №107 (2). – P. 147–154.

11. Elibuyuk I. Detection of a virus disease on Agaricus bisporus (white button mushroom) in Ankara, Turkey / Elibuyuk I., Bostan H. // International journal of agriculture & biology. – 2010. –№12.– P. 597-600.

12. Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom / Hollings M. // Nature – 1962. – №196. – P. 962-968.

13. MVX disease and double-stranded RNA elements in Agaricus bisporus / [Grogan H.M., Holcroft S., Adie B. Et al.] // Mushroom Science.– 2004.– №16.– P. 411-420.

14. Pudełko K. Mushroom virus X (MVX): a novel disease of mushrooms in Poland? / Pudełko K. //Journal of plant protection research.– 2010.– Vol. 50, №3.– P.366-371.

15. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties / [Fukuhara T., Koga R., Aoki N.et al.] // Archives of Virology. – 2006. – №151.– P. 995-1002.

16. Transmission of Mushroom Virus X disease in crops / [Grogan H.M.,

Tomprefa N., Mulcahy J. Et al.] // Mushroom Science.– 2004.– №16.– P. 489-498.

17. Wach M.P. Double-stranded RNA associated with La France disease of the commercial mushroom / Wach M.P., Sriskantha A. and Romaine C.P. // Phytopathology.– 1987.– №77.– P.1321-1325.

18. Van Der Lende T.R., Harmsent M.C., Wessels J.G.H. Doublestranded RNAs and proteins associated with the 34 nm virus particles of the cultivated mushroom Agaricus bisporus. J.//*Gen. Virology*.– 1994.– №75.– P. 2533-2536.

19. http://www.golosua.com/ekonomika/2010/03/11/ За 9 років виробництво грибів в Україні зросло у 26 разів.

20. http://medbiol.ru/medbiol/sol_vir/ Вирусы: классификации ранние.

21. http://www.nbuv.gov.ua/portal/Chem_Biol/sgmb/2008_7/2008/SM07_17.pdf/ Коломієць Л.П. Характеристики вірусів, що уражують картоплю.

Выявление вирусных заболеваний в плодовых телах шампиньона двуспорового

Т. В. Иванова

Изучены вирусные болезни шампиньона двоспорового (Agaricus bisporus) (J. Lge) Imbach). Внедрена методика идентификации длРНК выделенных из симптомных и с бессимптомных плодовых тел шампиньона двуспорового.

Ключевые слова: шампиньон двуспоровый, вирус, болезнь, идентификация, длРНК, электронная микроскопия.

Identification of virus diseases in fruit bodies of Cultivated Mushrooms

T. V. Ivanova

Investigated viral diseases of Agaricus bisporus (J. Lge) Imbach). Applied the methodology for identification dsRNA isolated from symptomatic and asymptomatic with mushroom fruiting bodies of mushroom.

Key words: mushroom, virus disease, identification, dsRNA, electron

microscopy.