

## МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ЗТ-ПЛР ДЛЯ МОНІТОРИНГУ ВІРУСНОГО ІНФЕКЦІЙНОГО ПРОЦЕСУ У РОСЛИН

Ю. С. Щукін<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0009-0003-5455-2564>,

О. Г. Коваленко<sup>1,2</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-1342-1045>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154; м. Київ, 03680, Україна

<sup>2</sup>Інститут біохімії і біофізики ПАН  
вул. Павінського, 5а; м. Варшава, 02-106, Польща

e-mail: udajko@ukr.net

**Мета.** З'ясувати можливості використання методу ЗТ-ПЛР для моніторингу вірусного інфекційного процесу у рослин. **Методи.** Екстракція нуклеїнових кислот із рослин тютюну та пшениці за СТАВ-протоколом і метод полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі зі стадією зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР). **Результати.** Створено й відпрацьовано методу ПЛР у реальному часі для моніторингу вірусного процесу у рослин. У роботі наведені оптимізовані протоколи виділення, праймера та флуоресцентні проби, а також склад буферу й підібраний протокол ампліфікації. Отримані дані свідчать про чутливість, специфічність та лінійність отриманих ПЛР-тест-систем у реальному часі, що дає змогу оптимізувати їх для кількісного визначення для подальшого використання в моніторингу вірусного інфекційного процесу у рослин. **Висновки.** На прикладі вірусів TMV та WSMV показана принципова можливість використання ЗТ-ПЛР-систем для кількісної оцінки перебігу вірусного інфекційного процесу у рослин. Отримані результати можуть бути використані для вивчення інших як ДНК-, так і РНК-вмісних вірусів. Пропонований метод має очевидні переваги перед методами виявлення й моніторингу вірусних інфекцій у рослин (чутливість, специфічність, можливість кількісного визначення вірусоспецифічних продуктів), які використовуються на сьогодні. Проте особливість його практичної реалізації полягає в необхідності вартісного обладнання й реактивів, а також в наявності підготовленого, кваліфікованого персоналу. Практична цінність методу зростає після його адаптації до моніторингу економічно важливих вірусів сільськогосподарських культур, які розмножуються вегетативно (картопля, полуниця, плодові культури).

Ключові слова: віруси рослин, моніторинг вірусного інфекційного процесу у рослин, вірус тютюнової мозаїки (*Tobacco mosaic virus, TMV*), вірус смугастої мозаїки пшениці (*Wheat Streak Mosaic Virus, WSMV*), полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі зі стадією зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР), екстракція нуклеїнових кислот з рослинного матеріалу.

**Вступ.** Одними з основних патогенів, що вражають рослини, зокрема сільськогосподарські, є віруси. Боротьба з ними вимагає комплексного підходу, одним із елементів якого є швидка діагностика хвороби та ідентифікація її збудника [1]. Основними мето-

дами визначення вірусної інфекції сьогодні є візуальне спостереження за рослинами, використання рослин-індикаторів (біотест) та імуноферментний аналіз (ІФА) [2]. Також впроваджуються нові молекулярно-генетичні методи, зокрема метод ЗТ-ПЛР [2]. Цей

метод дозволяє виявляти вірусні нуклеїнові кислоти з великою чутливістю (сотні копій геномів на мг біомаси), точністю та специфічністю.

Вищезазначені методи відрізняються за чутливістю, точністю, специфічністю, тривалістю проведення аналізу, а також фінансовими затратами. Хоча візуальне спостереження і є найбільш простим і дешевим засобом, за наявності видимих симптомів можна судити лише про присутність у рослині патогена. Метод рослин-індикаторів має такий самий недолік. Імуноферментний аналіз, орієнтований на визначення білків вірусу, дозволяє виявляти його на більш ранніх стадіях, але у порівнянні з методами, що базуються на полімеразній ланцюговій реакції, значно програє в чутливості. Крім того, синтез білків вірусу проходить на пізніх стадіях патогенезу і не дає змоги виявляти вірус на ранніх стадіях [3]. Побудова кількісної системи виявлення вірусів рослин методом ІФА є складним завданням. Наявність вірусних білків не перебуває у чіткій стехіометричній залежності від кількості вірусної нуклеїнової кислоти, тоді як присутність у рослині нуклеїнових кислот вірусу є 100 %-им маркером зараження рослини, що дає змогу виявляти інфекцію на найбільш ранніх стадіях патогенезу й завчасно вживати заходів для уникнення поширення вірусної інфекції.

**Метою** роботи було з'ясування можливостей використання методу ЗТ-ПЛР для моніторингу вірусного інфекційного процесу у рослин.

#### **Матеріали та методи.**

**Об'єкти досліджень.** Для відпрацювання методики діагностики вірусної інфекції рослин методом ПЛР у реальному часі ми вибрали вірус тютюнової мозаїки (Tobacco mosaic virus, TMV) як найбільш досліджений модельний вірус і вірус смугастої мозаїки пшениці (Wheat Streak Mosaic Virus, WSMV).

У роботі використано рослини *Nicotiana tabacum* L. сорту Трапезунд та *Triticum aestivum* L. сорту Зимоярка, здорові й інфіковані вірусами TMV (штам U<sub>1</sub>) і WSMV відповідно. В окремих варіантах зразки тканин для дослідження були отримані з TMV-інфікованого калюсу тютюну, оздоровлюваного в присутності ліпосомальних біонанокмпозитів (БНК) [4], або з інтактних рослин пшениці, вирощеної за передпосівної оброб-

ки насіння БНК та/або мікробними препаратами [5].

#### **Використані реактиви та обладнання.**

У дослідженнях використовували ампліфікатор Biorad (C1000/CFX96), термостат BIOSAN TDB-120, мініцентрифугу BIOSAN MICROSPIN 12, BIOBASE Benchtop pH-meter pH-210, дозатори змінного об'єму одноразові RNase/DNase free пластик та інше загальнолабораторне обладнання.

Для приготування буферів для екстракції нуклеїнових кислот використано такі реагенти: Цетилтриметиламоніум бромід (CTAB), Molecular Biology Grade, Sigma (219374-100GM); NaCl, ACS reagent,  $\geq 99,0\%$ , Merck (S9888); Тріс амінометан, ACS reagent,  $\geq 99,0\%$ , Merck (252859); Полівінілпіролідон-40 (PVP-40), Merck (PVP40-100G); ЕДТА, ACS reagent, Merck (E9884); 2-меркаптоетанол,  $\geq 99,0\%$ , Merck (M6250); Lithium chloride, Molecular Biology,  $\geq 99\%$ , Merck (L9650-100G).

Суміші для ампліфікації готували за використання таких реагентів: Hot Start Taq DNA Polymerase, NEB (M0495); M-MuLV Reverse Transcriptase NEB (M0253L); Standard Taq Reaction Buffer NEB (B9014S) with MgCl<sub>2</sub> and dNTP; олігонуклеотиди й плазмідні вектори (pUC19) зі вставленими відповідними для кожного вірусу послідовностями, замовлені в «Azenta life science».

**Екстракція нуклеїнових кислот.** У роботі випробувано декілька варіантів екстракції нуклеїнових кислот з рослинного матеріалу: СТАВ-протокол, СТАВ-протокол з озвучуванням зразків, виділення нуклеїнових кислот із попередньо отриманих протопластів [6] набором ТОВ «ІНЖЕНІКО» PrEx — преципітація ДНК/РНК за протоколом виробника. Серед цих протоколів для подальших досліджень вибрано СТАВ-протокол [7] в нашій модифікації, що передбачало обробку отриманих ізолятів нуклеїнових кислот ДНК-азою, елюцією в 500 мкл ТЕ буферу і подальшим зберіганням екстрагованих зразків за температури  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Підбір і дизайн праймерів.** Для виявлення вірусів тютюнової мозаїки та смугастої мозаїки пшениці підібрано специфічні та унікальні праймери до регіонів TMVgp3 геному TMV та P3 геному WSMV. Вибірка повногеномних сиквенсів була взята з бази даних NCBI virus. Вирівнювання й пошук консервативних послідовностей проводили

в програмі Snapgene. Дизайн праймерів та їхній аналіз на наявність димерів проводився у веб-інтерфейсі (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Підібрані праймери наведені в табл.

**Ампліфікація нуклеїнових кислот.** Реакційна суміш для проведення ампліфікації мала кінцевий об'єм 50 мкл і складалася з M-MuLV ревертази, Hot Start Taq ДНК полімерази, буфера для проведення реакції доданих згідно з рекомендаціями виробника. Також вона містила 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 uM dNTP, 0,3 uM TMV\_F, 0,2 uM TMV\_P, 0,3 uM TMV\_R і стерильну воду. Для приготування буферу для ампліфікації WSMV використовували ті самі параметри.

Ампліфікація нуклеїнових кислот проводилася за такою програмою: ревертазна реакція (45 °C — 15 хв.); початкова денатурація (95 °C — 5 хв.); 5 циклів денатурації (95 °C — 5 с) та відпалювання, без зчитування (60 °C — 40 с); 45 циклів денатурації (95 °C — 5 с) та відпалювання, зі зчитуванням (60 °C — 40 с).

Для побудови стандартної кривої і визначення лінійності реакції використовували серійні розведення плазмідної ДНК, встановленої виробником концентрації з вбудованим ампліконом відповідного вірусу.

**Результати та їх обговорення.** Результати ампліфікації інфікованих TMV рослин наведені на рис. 1А. Для валідації тест-системи були відібрані 5 зразків інфікованого матеріалу з різним інфекційним навантаженням та 10 здорових. Як позитивний контроль використовували розчин плазмід з вбудованим ампліконом. Наведені дані свідчать про специфічність і можливість використання цих послідовностей. Для визначення лінійності й чутливості був використаний метод серій-

них розведень плазмід (рис. 1Б) і побудована стандартна крива для набору (рис. 1В).

Результати ампліфікації інфікованих WSMV рослин наведені на рис. 2А. Для валідації тест-системи відібрано 4 інфіковані рослини на різних стадіях розвитку інфекції та 10 здорових. Як позитивний контроль використовували розчин плазмід з вбудованим ампліконом. Для визначення лінійності й чутливості був використаний метод серійних розведень плазмід (рис. 2Б) і побудована стандартна крива для набору (рис. 2В).

Отже, наведені дані для обох наборів свідчать про їхню специфічність, чутливість і лінійність. Ці характеристики дозволяють надалі оптимізувати їх для використання як кількісних наборів для визначення нуклеїнових кислот.

На сьогодні використання ПЛР для діагностики інфекційних хвороб є досить розповсюдженим і широко використовується у діагностичній практиці. Незважаючи на наявність у науковій літературі статей з виявлення вірусів TMV [8–10] та WSMV [11; 12], зокрема у реальному часі, ми не знайшли даних про використання ЗТ-ПЛР-наборів для кількісного визначення. Наша робота створює підґрунтя для розробки кількісного визначення параметрів вірусного інфекційного процесу у рослин, яке може бути широко використано як у наукових, так і в прикладних дослідженнях із фітовірусології та фітопатології.

**Висновки.** Показана принципова можливість використання ЗТ-ПЛР систем для кількісної оцінки перебігу вірусного інфекційного процесу у рослин, наразі ця можливість підтверджена нами для TMV та WSMV. Отримані результати можуть бути викорис-

*Таблиця. Праймери для виявлення вірусів тютюнової мозаїки та смугастої мозаїки пшениці*

Назва	Флуорофор	Послідовність (5'-3')	Гасник	Розмір амплікону
TMV_F		GGTCTCTTTGTGATGTTGCTG		185 пар основ
TMV_P	Cy5	GCGTCGTCCAAGTGTGTGTAATAC	BHQ-3	
TMV_R		CCTTTAACAAGTAGAGCCATCT		
WSMV_F		ATGAAAGCTGAGATGATGCAATA		318 пар основ
WSMV_P	ROX	TCCTCGGAGATAGCGTGTCAACC	BHQ-2	
WSMV_R		CCTCAAGGAAGTCCCTTGT		

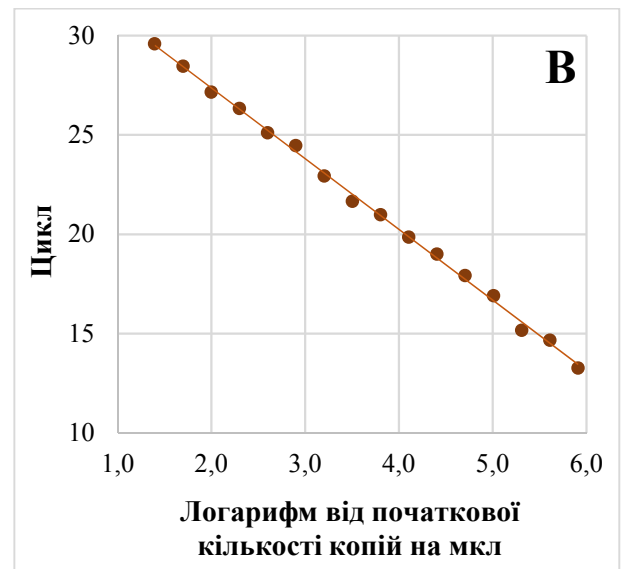
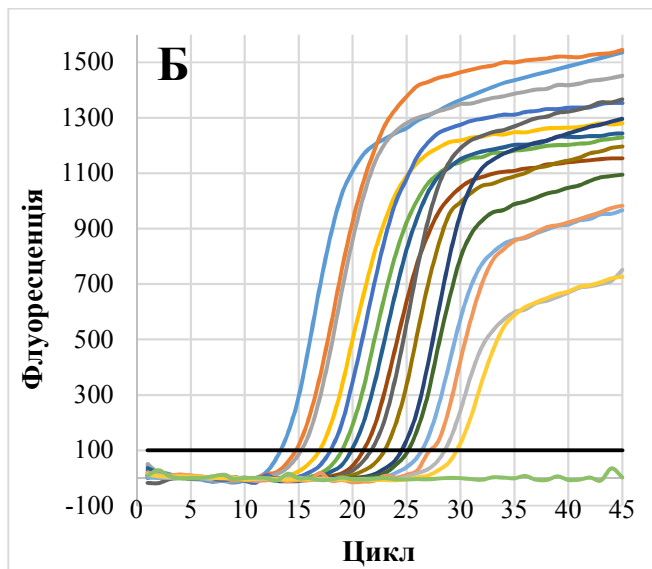
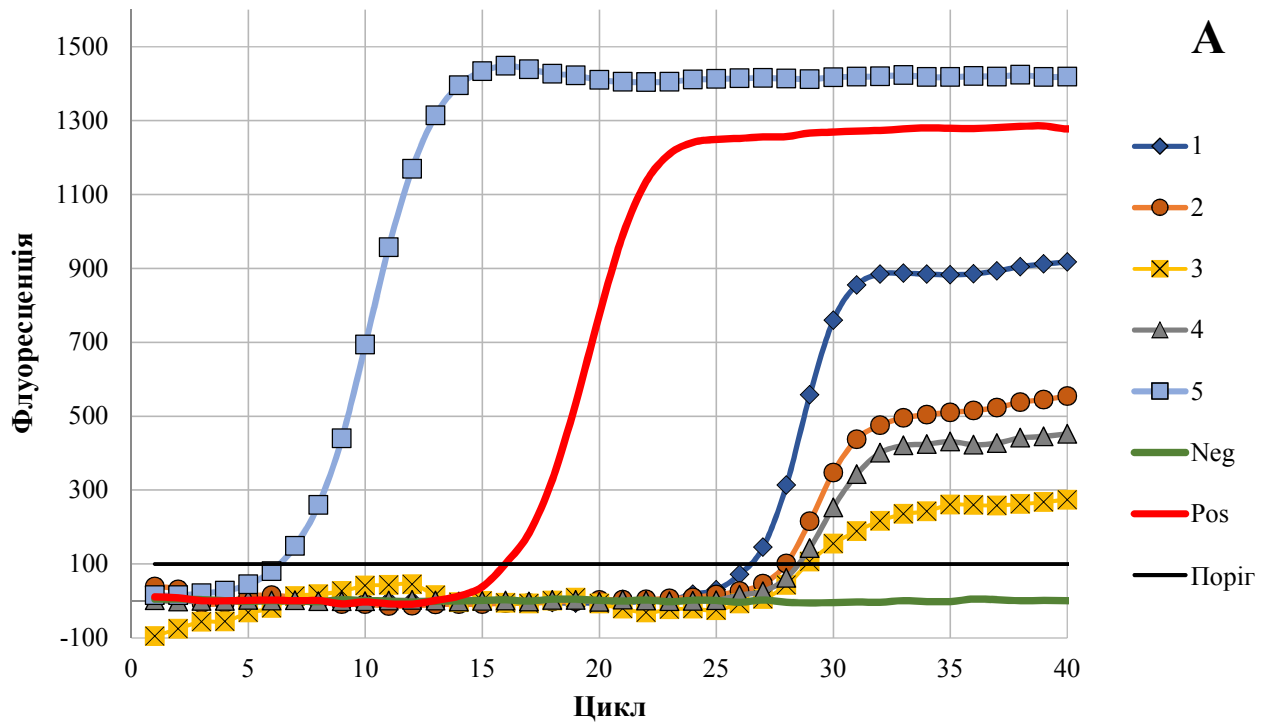


Рис. 1. А — криві ампліфікації зразків *TMV*; Б — ампліфікація двократних розведень плазмиди із вбудованим ампліконом *TMV*; В — стандартна крива, побудована на розведеннях плазмиди з вбудованим ампліконом *TMV*.

тані для вивчення інших як ДНК-, так і РНК-вмісних вірусів. Зокрема, практична цінність методу зростає після його адаптації до моніторингу економічно важливих вірусів сільськогосподарських культур, які розмножуються вегетативно (картопля, полуниця, плодови культури).

Метод має очевидні переваги перед методами моніторингу вірусних інфекцій у рослин (чутливість, специфічність, можливість кількісного визначення вірусоспецифічних продуктів), які використовуються на сьо-

годні. Особливість його практичної реалізації, однак, полягає в необхідності вартісного обладнання й реактивів, а також в наявності підготовленого, кваліфікованого персоналу.

**Подяки:** Ця робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках науково-дослідних проектів (0125U000536, 0125U000535) і Польською академією наук через «Довгострокову програму підтримки українських дослідницьких колективів» (PAN.BFB.S.BWZ.407.022.2024).

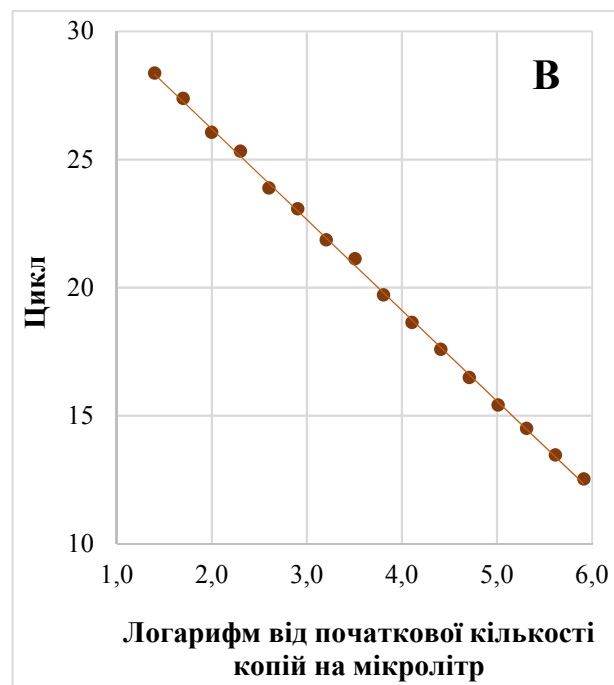
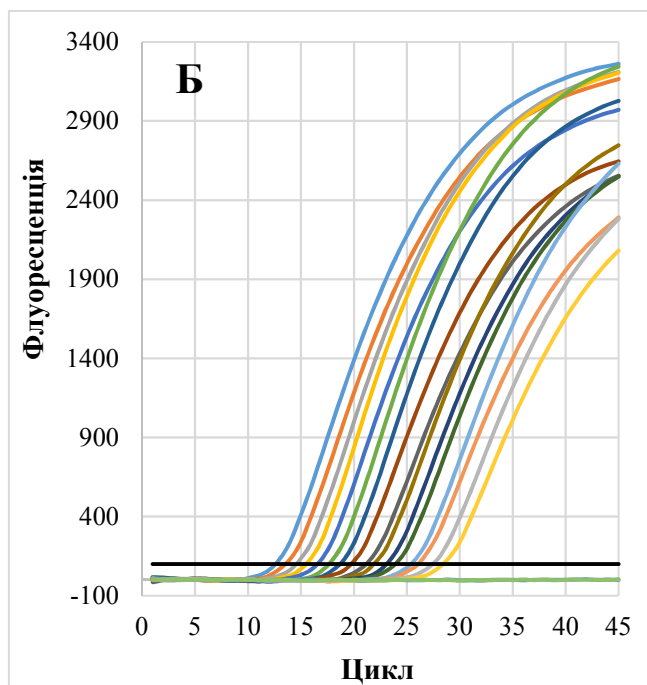
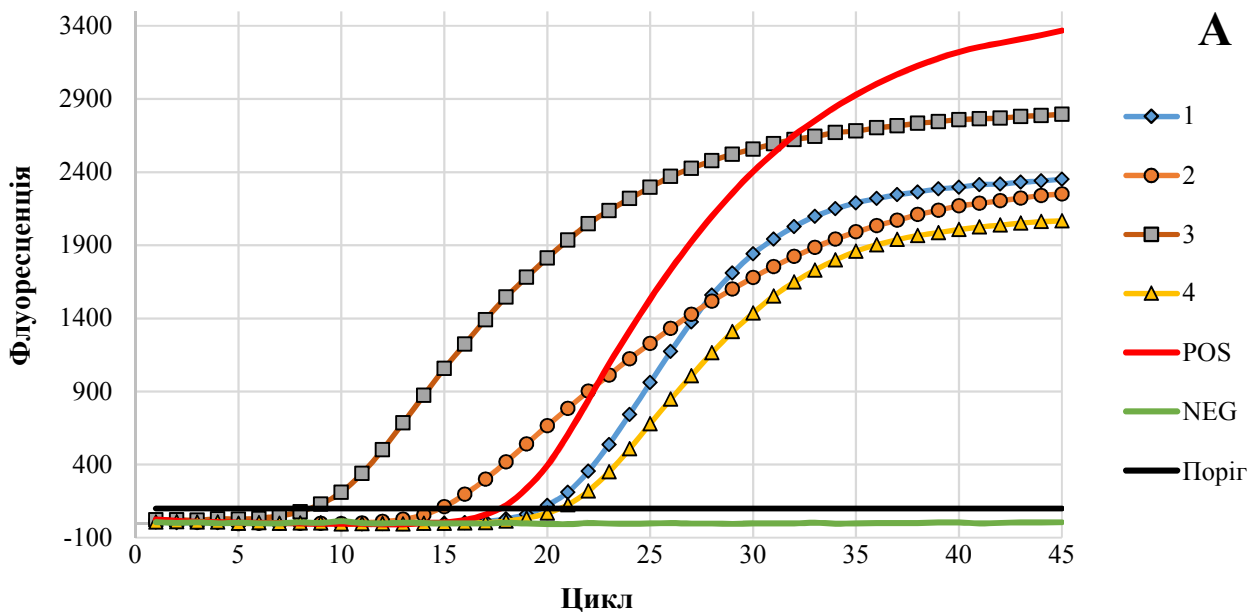


Рис. 2. А — криві ампліфікації зразків WSMV; Б — ампліфікація двократних розведень плазмиди із вбудованим ампліконом WSMV; В — стандартна крива, побудована на розведеннях плазмиди з вбудованим ампліконом WSMV.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Anikina I., Kamarova A., Issayeva K., Issakhanova S., Mustafayeva N., Insebayeva M. ... Raposo A. Plant protection from virus: a review of different approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2023. № 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163270>

2. Burgess S. *Plant cell protoplast isolation*. Vol. 1. 2016. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.ftnbnme>

3. Deb M., Anderson J. M. Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne

wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 148, № 1–2. P. 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.015>

4. Han S., Zhou T., Zhang F., Feng J., Han C., Maimaiti Y. One-Step Multiplex RT-PCR Method for Detection of Melon Viruses. *Microorganisms*. 2024. Vol. 12, № 11. 2337. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112337>

5. Kanapiya A., Amanbayeva U., Tulegenova Z., Abash A., Zhagazin S., Dyussebayev K., Mukiyanova, G. Recent advances and challenges in plant viral diagnostics. *Frontiers in Plant Science*. 2024. № 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1451790>

6. Kiss T., Karácsony Z., Gomba-Tóth A., Szabadi K. L., Spitzmüller Z., Hegyi-Kaló J. ... Váczky K. Z. A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono- and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. *Plant Methods*. 2024. Vol. 20, № 1. P. 62. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01198-z>

7. Kovalenko O. Liposomal strategy in growing, recovering and protecting plants against viral infections. X International Conference "Bioresources and Viruses": Book of abstracts (Kyiv, the 11–13 of September). Kyiv, 2023. P. 50.

8. Kovalenko O., Kyrychenko A., Shchukin Y. Liposomal Ganoderma adspersum [Schulzer] Donk promotes elimination of tobacco mosaic virus from *Nicotiana tabacum* callus tissue in vitro. XVI з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського: тези доповідей (м. Тернопіль, 2–6 червня). Тернопіль, 2025. С. 297.

9. Kumar S., Udaya Shankar A. C., Nayaka S. C., Lund O. S., Prakash, H. S. Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and

tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 2011. Vol. 53, № 3. P. 359–363. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x>

10. Liu H., Wu K., Wu W., Mi W., Hao X., Wu, Y. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. *Journal of Virological Methods*, 2019. Vol. 265. P. 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.011>

11. Mekuria G., Ramesh, S. A., Alberts E., Bertozzi T., Wirthensohn M., Collins G., Sedgley M. Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*. 2003. Vol. 114, № 1. P. 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.014>

12. Price J. A., Smith J., Simmons A., Fellers J., Rush C. M. Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of Virological Methods*. 2010. Vol. 165, № 2. P. 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.019>

Отримано: 18.08.2025

Прийнято до друку: 30.09.2025

Опубліковано онлайн: 29.12.2025

<https://doi.org/10.35868/1997-3004.42.110-116>

UDC 578.865.1

## POSSIBILITIES OF USING THE RT-PCR METHOD FOR MONITORING VIRAL INFECTION PROCESSES IN PLANTS

Yu. S. Shchukin<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0009-0003-5455-2564>,

O. H. Kovalenko<sup>1,2</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-1342-1045>

<sup>1</sup>D. K. Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw

e-mail: udajko@ukr.net

**Objective.** To determine the possibilities of using the RT-PCR method for monitoring viral infectious processes in plants. **Methods.** Extraction of nucleic acids from tobacco and wheat plants using the STAV protocol and real-time polymerase chain reaction with reverse transcription stage (RT-PCR). **Results.** A real-time PCR method for monitoring viral processes in plants has been created and tested. The study presents optimized protocols for isolation, primers, and fluorescent probes, as well as buffer composition and a selected amplification protocol. The data obtained indicate the sensitivity, specificity, and linearity of the real-time PCR test systems, which allows them to be optimized for quantitative determination for further use in monitoring the viral infection process in plants. **Conclusions.** The example of TMV and WSMV viruses demonstrates the fundamental possibility of using RT-PCR systems for quantitative assessment of the viral infection course in plants. The results obtained can be used to study other DNA- and RNA-containing viruses. The proposed method has obvious advantages over the methods of detection and monitoring of viral infec-

tions in plants (sensitivity, specificity, the possibility of quantitative determination of virus-specific products) that are currently used. However, the peculiarity of its practical implementation is the need for expensive equipment and reagents, as well as the availability of trained, qualified personnel. The practical value of the method will increase after its adaptation to the monitoring of economically important viruses of agricultural crops that reproduce vegetatively (potatoes, strawberries, fruit crops).

Key words: *plant viruses, monitoring of viral infectious processes in plants, tobacco mosaic virus (Tobacco mosaic virus, TMV), wheat streak mosaic virus (Wheat Streak Mosaic Virus, WSMV), real-time polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR), extraction of nucleic acids from plant material.*

#### REFERENCES

1. Anikina, I., Kamarova, A., Issayeva, K., Is-sakhanova, S., Mustafayeva, N., Insebayeva, M. ... Raposo, A. (2023). Plant protection from virus: a review of different approaches. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1163270>
2. Burgess, S. (2016). *Plant cell protoplast isolation*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.ftnbnme>
3. Deb, M., & Anderson, J. M. (2008). Development of a multiplexed PCR detection method for Barley and Cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 148(1–2), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.10.015>
4. Han, S., Zhou, T., Zhang, F., Feng, J., Han, C., & Maimaiti, Y. (2024). One-Step Multiplex RT-PCR Method for Detection of Melon Viruses. *Microorganisms*, 12(11), 2337. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12112337>
5. Kanapiya, A., Amanbayeva, U., Tulegenova, Z., Abash, A., Zhagazin, S., Dyussebayev, K., & Mukiyanova, G. (2024). Recent advances and challenges in plant viral diagnostics. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1451790>
6. Kiss, T., Karácsony, Z., Gomba-Tóth, A., Szabadi, K. L., Spitzmüller, Z., Hegyi-Kaló, J. ... Váczy, K. Z. (2024). A modified CTAB method for the extraction of high-quality RNA from mono-and dicotyledonous plants rich in secondary metabolites. *Plant Methods*, 20(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01198-z>
7. Kovalenko, O. (2023, September). Liposomal strategy in growing, recovering and protecting plants against viral infections. Book of abstracts of the X International Conference «Bioresources and Viruses» (pp. 50–50), Kyiv.
8. Kovalenko, O., Kyrychenko, A., & Shchukin, Y. (2025, June). Liposomal Ganoderma adsorbent [Schulzer] Donk promotes elimination of tobacco mosaic virus from *Nicotiana tabacum* callus tissue in vitro. Abstracts of reports of the XVI Congress of Vinogradskyi society of microbiologists of Ukraine (pp. 297–297), Ternopil.
9. Kumar, S., Udaya Shankar, A. C., Nayaka, S. C., Lund, O. S., & Prakash, H. S. (2011). Detection of Tobacco mosaic virus and Tomato mosaic virus in pepper and tomato by multiplex RT-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 53(3), 359–363. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x>
10. Liu, H., Wu, K., Wu, W., Mi, W., Hao, X., & Wu, Y. (2019). A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of six main RNA viruses in tomato plants. *Journal of Virological Methods*, 265, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.12.011>
11. Mekuria, G., Ramesh, S. A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., & Sedgley, M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* and *prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*, 114(1), 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.014>
12. Price, J. A., Smith, J., Simmons, A., Fellers, J., & Rush, C. M. (2010). Multiplex real-time RT-PCR for detection of Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Journal of Virological Methods*, 165(2), 198–201. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.01.019>

Received: 18.08.2025

Accepted: 30.09.2025

Published online: 29.12.2025