УДК 602.6:632.3:633.63

ПЛР ДІАГНОСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ ЖОВТЯНИЦІ БУРЯКА

І. М. Андрусик, аспірант**,** Національний університет біотехнології та природокористування України
І. О. Антіпов, к.с.-г.н., доцент, Національний університет біотехнології та природокористування України
А. М. Кириченко, к.б.н., старший науковий співробітник, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного

Розроблено тест-систему для діагностики та ідентифікації вірусу жовтяниці буряка методом ПЛР. Оптимізовано умови проведення реакції ампліфікації. Проведено скринінг вірусу жовтяниці буряка в Київській області. Тест-системи на основі розроблених ПЛР-діагностикумів українських ізолятів вірусу жовтяниці буряка необхідно (або можна) впроваджувати в лабораторну практику фітосанітарного контролю.

***Ключові слова**: вірус жовтяниці буряка, тест-система, праймери, ПЛР, рослини-індикатори*

Постановка проблеми. Вірусні захворювання групи жовтяниць завдають значних втрат урожаю цукрових буряків. Залежно від вірусу й терміну ураження втрати урожаю коренеплодів становлять від 40 до 60%, а вихід цукру – від 50 до 80%. Вірус жовтяниці буряка (ВЖБ) – найбільш шкідливий із комплексу вірусів, що уражують цукрові буряки [1].

Вірусна інфекція проявляється на зовнішньому вигляді рослини, хоча це є відображенням внутрішньоклітинних змін, викликаних вірусом. Симптоми ураження можуть бути різними і залежать від рослини-господаря, тривалості інфекції та умов зовнішнього середовища. Для ідентифікації вірусу за візуальними симптомами використовують рослини-індикатори [2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Загальна характеристика вірусу жовтяниці цукрового буряка і застосування молекулярно-біологічних методів діагностики наводяться в працях Н. Сенчугової,О. Постоєнко, В. Бойка, І. Лялько, В. Горюшина, Ю. Власова, О. Дяконова, В. Рогова, Н. Порембської, В. Колесникової, Г. Краєвої, О. Аграновського, І. Бобкової, І. Попової та інших.

Виходячи з аналізу наукової літератури, встановлено, що *вірус жовтяниці цукрового буряка* (Beet yellows virus, BYV) належить до родини Closteroviridae, рід Closterovirus. Вірус вперше було описано в Бельгії ще у 1936 році Роландом на рослинах буряка – Beta vulgaris L. Геном представлений однією молекулою однониткової РНК.

Вихідний матеріал, методика та умови дослідження. Консервативні нуклеотидні послідовності гену, що кодує білок оболонки вірусу жовтяниці буряку встановлювали, використовуючи нуклеотидні послідовності ізолятів вірусів депонованих в систему генетичного банку даних (NCBI).

Матеріалом для дослідження були листкові пластинки рослин буряка гібридів Кармеліта, Альона, Настя, Джорджина, Лавінія, Леопард, відібраних в агроценозах Агрономічної дослідної станції (Київська область, Васильківський район, с. Пшеничне) із симптомами захворювання ВЖБ.

Екстракцію РНК проводили за допомогою комерційного набору «РИБО-сорб» (AmpliSens, Росія) згідно рекомендацій виробника. Зворотну транскрипцію проводили застосовуючи комплект реагентів Реверта-L, (AmpliSens, Росія) згідно рекомендацій виробника. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems). При проведенні ПЛР використовували специфічні олігонуклеотидні праймери, специфічні до консервативних ділянок геномів вірусу мозаїки буряка та вірусу жовтяниці буряка. Режим ампліфікації наступний: 5хв. за 95^0С денатурація к ДНК, наступні 30 циклів 30с за 95^0С денатурація, 30 с за 55^0С – відпал праймерів, 30 с за 72^0С – синтез комплементарних ланцюгів ДНК. Після закінчення ПЛР проводили електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації у 1,5%-му агарозному гелі з додаванням бромового етидію у концентрації 0,5 мкг/мл. Детекцію продуктів ампліфікації проводили методом електрофорезу в агарозному гелі, забарвленому бромідом етидія, з використанням тріс-боратного буфера при градієнті напруги 10 В/см [3].

Для ідентифікації і підтвердження присутності вірусу жовтяниці буряка у відібраних зразках використовували рослини-індикатори (Chenopodium amaranticolor L.). Для ефективного проведення інокуляції інфекційний сік стабілізували 0,1 М фосфатно-буферним розчином pH 7,2.

Результати досліджень та їх обговорення. З метою виявлення вірусного захворювання було проведено візуальне обстеження посівів цукрових буряків на дослідних полях Київської області, та відібрано рослини цукрових буряків з чіткими симптомами прояву вірусу жовтяниці цукрового буряка, описаними раніше [4]. Симптоми ураження вірусом жовтяниці буряка проявляються у просвітлінні жилок на молодих листках і листя, інфіковані цим вірусом, набувають світло-жовтого кольору та інколи проявляються червоно-коричневі вкраплення (рис. 1.).

Метод ПЛР дозволяє виявити наявність конкретної послідовності нуклеїнової кислоти вірусу у зразках і завдяки своїй високій чутливості визначає одиничні копії геномів патогенів [5].

Рис. 1. Симптоми вірусу жовтяниці буряка на листкових пластинах цукрового буряка гібриду Леопард (А – контроль, Б – симптоми, викликані BYV)

На сьогоднішній день ПЛР-аналіз є однією із найбільш поширених технологій лабораторної діагностики, що динамічно розвиваються. Проте, у зв'язку із неконтрольованим надходженням посадкового матеріалу, на територію нашої держави потрапляють нові фітопатогенні мікроорганізми, що вимагає посиленої уваги до розробок специфічних тест-систем для виявлення збудників вірусних захворювань.

Практичне значення роботи визначається тим, що створені тест-системи прості й зручні для лабораторного застосування і дозволяють з високою чутливістю і специфічністю визначати присутність вірусу жовтяниці буряка в зразках, що досліджуються.

Початковою стадією в розробці тест-системи ПЛР є створення дизайну праймерів. Дизайн олігонуклеотидних затравок розробляли з використанням програмного забезпечення Primer 3 [9]. Консервативні ділянки вірусних геномів визначали, аналізуючи відомі нуклеотидні послідовності різних ізолятів вірусу жовтяниці буряка.

Специфічність ПЛР також залежить від температури відпалу праймерів, яка розраховується теоретично, виходячи з характеристик праймерів, але вимагає тестових лабораторних підтверджень. Підвищення температури відпалу праймерів збільшує специфічність реакції, зменшення температури відпалу праймерів – знижує специфічність реакції, але при цьому збільшується вихід продуктів ПЛР [7].

Методика стандартної ПЛР передбачає підготовку проб, екстракцію РНК, проведення зворотної транскрипції, ампліфікацію та електрофорез продуктів реакції [8].

На електрофореграмі відзначали наявність (або відсутність) яскраво-червоних ампліконів певного розміру (рис. 2). Специфічність ампліфікованого фрагменту ДНК визначали за його розміром по відношенню до фрагментів стандартних маркерів.

Нами проведено діагностику зразків гібридів цукрових буряків – Леопард, Настя, Альона, Кармеліта, Лавінія, Джорджина (рис. 2).

У зразках гібридів Леопард, Альона та Настя виявлено присутність вірусу жовтяниці буряка. Розмір продукту ампліфікації – 392 нуклеотиди. Наявність відповідного розміру ампліконів свідчить про ефективність розробленої діагностичної тест-системи.

При ураженні цукрових буряків вірусом мозаїки буряка симптоми хвороби проявляються у просвітленні жилок, мозаїчному малюнку на молодих листках, виникненні дрібних, різних за формою плям. Спостерігається затримка росту, що призводить до карликовості рослин. У зразках гібридів Настя, Альона, Кармеліта і Джорджина розмір продукту ампліфікації (239 п.н.) свідчить про наявність Beet mosaic virus (BtMV) .

Результати діагностики та ідентифікації запропонованими створеними тест-системами наведені у таблиці 1.

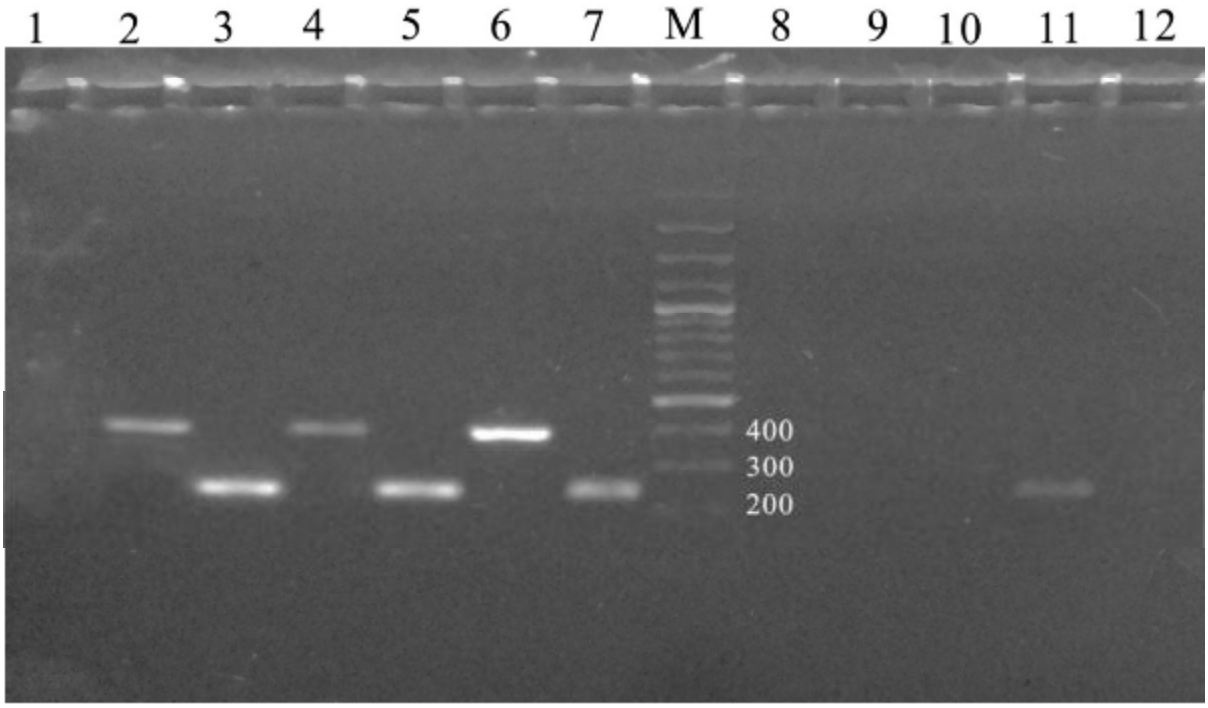

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу визначення вірусу мозаїки буряка (трек 1, 3, 5, 7, 9, 11) та вірусу жовтяниці буряка (трек 2, 4, 6, 8, 10, 12). 1-12 –зразки гібридів цукрових буряків, що аналізувалися (1, 2 – Леопард; 3, 4 – Настя; 5, 6 – Альона; 7, 8 – Кармеліта; 9, 10 – Лавінія; 11, 12 – Джорджина). (М) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

Таблиця 1

Результати діагностики зразків цукрових буряків з дослідних ділянок Агрономічної дослідної станції

№ з/п	Зразок	ВМБ	ВЖБ
1	Леопард	-	+
2	Настя	+	+
3	Альона	+	+
4	Кармеліта	+	-
5	Лавінія	-	-
6	Джорджина	+	-

Вірус мозаїки буряка виявлено в чотирьох зразках: Настя, Альона, Кармеліта і Джорджина, а вірус жовтяниці буряка – у трьох зразках: Леопард, Настя, Альона. Окрім того, наведені результати свідчать, що мала місце змішана вірусна інфекція. Так, зразки гібридів Настя та Альона інфіковані одночасно вірусом мозаїки буряка та вірусом жовтяниці буряка.

Штучне ураження рослин проводили механічним шляхом. Інфекційний сік отримали із зразків цукрових буряків гібриду Альона, де за допомогою ПЛР аналізу виявлено присутність вірусу.

Біологічне тестування вирощених у теплиці рослин, в цілому, підтвердило їх ураження BYV. Симптоми на рослинах-індикаторах проявляються у вигляді пожовтіння середніх і нижніх листків, які стають більш товстими і крихкими (рис. 3).

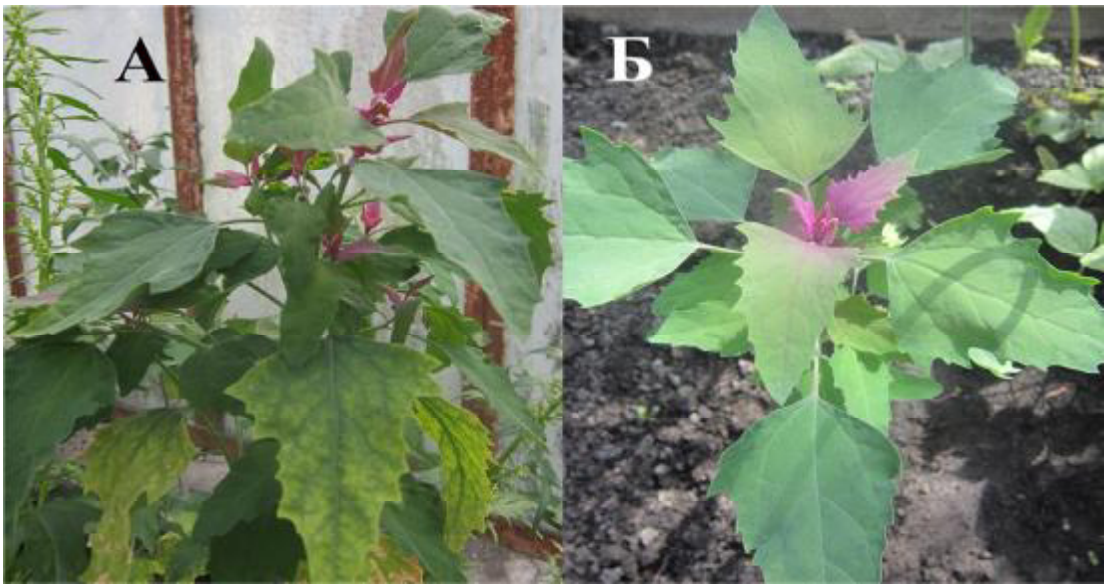

Рис. 3. Рослини-індикатори лободи червоної (*Chenopodium amaranticolor L.*):
А – помітні ознаки пожовтіння на 10 добу після інокуляції в умовах теплиці; Б – контроль

У результаті дослідження були випробувані наступні температури відпалу праймерів: 54ºС, 56ºС, 58ºС, 60ºС, 62ºС. Вихід основного продукту реакції найвищий при температурі 56ºС.

Висновки. Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей генів, що кодує білок оболонки вірусу. Показано консервативні ділянки нуклеотидних послідовностей вірусу жовтяниці буряка (BYV). На основі проведеного аналізу створено дизайн праймерів. Перевірено п`ять температурних режимів та встановлено оптимальну температуру відпалу праймерів – 56°С. Проведено механічне ураження рослин-індикаторів і виявлено симптоми вірусного ураження на чутливих рослинах.

Список використаної літератури:

1. Лялько И. М. Изучение вирусных болезней сахарной свеклы в процессе селекции на повышение устойчивости к заболеваниям: автореф. дис.канд. биол. Наук, спец.: 06.01.05 / Лялько Ирина Михайловна; Всерос. НИИ сах. свеклы и сахара им. А. Л. Мазлумова. – Рамонь, 2001. – 23 с.

2. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навч. посіб. / Мельничук М. Д. – К.: Поліграфколсантінг, 2005. –108 с.

3. Пат. 2017820 Российская Федерация, C12N15/40.Фрагмент комплементарной ДНК вируса желтухи сахарной свеклы, кодирующий ген капсидного белка / Аграновский А. А.; Бойко В. П.; Карасев А. В.; Доля В. В.; Атабеков И. Г.; заявитель Институт иммунобиотехнологии – 4950054/13; Патентообладатель Акционерное общество закрытого типа "Институт биотехнологии"; заявл. 27.06.91; опубл. 15.08.94.

4. Поліщук В. П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія» / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, Т. П. Шевченко. – К. : Фітосоціоцентр, 2005. – С. 129-133.

5. Роїк М. В. Хвороби коренеплодів цукрових буряків: [монографія] / Роїк М., Нурмухаммедов А., Корнієнко А. – К. : Поліграфколсантінг, 2004. – 224 с.

6. Шпаар Д. Сахарная свекла. Выращивание, уборка и хранение / Шпаар Д. – М. : DLV АГРОДЕЛО, 2006. – 207 с.

7. Bennett C. W. Sugar beet yellows disease in the United States / C. W. Bennett // U.S. Dept. of Agriculture , 1960. – 63 p.

8. Markoulatos P. Multiplex polymerase chain reaction : a practical approach / P. Markoulatos, N. Siafakas, M. Moncany // J. Clin. Laborat. Analysis. – 2002. – V. 16. – P. 47–51.

9. Primer 3 (v. 0.4.0) Pick primers from a DNA sequence : [Електронний ресурс]. – Режим доступу : http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/.

10. Roux K. H. Optimization and troubleshooting in PCR / K. H. Roux // PCR primer: a laboratory manual. – New York : Cold Spring Harbour Laboratory Press. – 1995. – P. 53–62.

11.Saiki R. K. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel // Science. – V. 239. – № 4839. – 1988. – P. 487–491.

12.Van der Merve M. Grapevine viruses: sensitive detection by PCR / M. Vander Merve // Plantprotectionnews. – 2000. – V. 58. – P. 7–10.

ПЦР ДИАГНОСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ЖЕЛТУХИ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

И. М. Андрусык, И. А. Антипов, А. Н. Кириченко

Разработана тест-система для диагностики и идентификации вируса желтухи свеклы методом ПЦР. Отработано условия проведения амплификации. Определена оптимальная температура отжига праймеров. Проведен биотест вирусной инфекцией инокуляцией растений-индикаторов. Тест-системы на основе разработанных ПЦР-диагностикумов украинских изолятов вируса желтухи свеклы необходимо внедрять в лабораторную практику фитосанитарного контроля.

***Ключевые слова**: вирус желтухи сахарной свеклы, тест-система, праймери, ПЛР.*

PCR DIAGNOSIS AND IDENTIFICATION OF SUGAR BEET YELLOW VIRUS

I.M. Andrusyk, I.O. Antipov, A.M. Kyrychenko

It was developed test-system for diagnostic and identification of beet yellows virus of method PCR. Conditios for amplification have been worked out. The optimum annealiny temperature of primers has been determined. A biotest for viral infection of plants inoculated indicator has been done. Test systems based on the developed PCR diagnostics of ukrainian isolates of beet yellows virus is necessary to introduce into laboratory practice phytosanitary control.

***Key words**: beet yellows virus, polymerase chain reaction, test-system, primers, PCR.*

Дата надходження до редакції: 30.10.2013
Рецензент: Г.О. Жатова