

РОЗРОБКА СИСТЕМИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ ТА ЙОГО МОНІТОРИНГ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

К. В. ГРИНЧУК¹, І. О. АНТІПОВ¹, М. В. ЄРМОЛАСВ²

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України,

² Державна установа «Центральна фітосанітарна лабораторія»

e-mail: blackgrampus@ukr.net

Здійснено ІФА скринінг вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ) в агроценозах України, а саме в Західній та Центральній частині України та показано наявність ВНПЖБ в зразках коренеплодів цукрового буряку, відібраних в Чемеровецькому районі Хмельницької області. Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей ізолятів ВНПЖБ, депонованих в генетичний банк даних. Встановлено консервативні послідовності гену, що кодує білок оболонки та розроблено дизайн праймерів специфічних до нуклеотидних послідовностей геному ВНПЖБ. Синтезовано специфічні олігонуклеотидні праймери, проведено лабораторне випробування та здійснено оптимізацію проведення полімеразної ланцюгової реакції за основними показниками. Оптимальна температура гібридизації праймерів становила 54 °С – 62 °С, а найвищий вихід ампліконів був зареєстрований за концентрації іонів магнію 2,5 мМ.

Ключові слова: діагностика, ПЛР, вірус некротичного пожовтіння жилок буряку.

Вступ. Перші повідомлення про появу ризоманії, збудником якої є вірус некротичного пожовтіння жилок буряку, з'явилися в Італії в 1952 році. Через десять років хвороба цілком охопила північну й східну частину Центральної Італії. Вірус має вузьке коло рослин хазяїв, які обмежуються видами родини *Chenopodiaceae*. Потенційні втрати врожаю можуть сягати до 80-90% (Tamada, 1975). ВНПЖБ передається грибом *Polymyxa betae*, який відноситься до родини *Plasmodiophoraceae*, класу *Plasmodiophoromycetes* (R. Koenig et al, 2000).

Сиквенс РНК-2 ВНПЖБ, опублікований S. Bouzoubaa та ін. у 1986 році, був використаний С. Henry для дизайну пари праймерів для проведення зворотньої транскрипції та ПЛР ампліфікації: Forward¹⁸⁰⁰5'-ACT CGG CAT ACT ATT CAC T(T)-3¹⁷⁸¹, Reverse¹³⁰¹5'-CGA TTG GTA TGA GTG ATT T(A)-3¹³²⁰, з розміром продукту ампліфікації 500 п.н (Bouzoubaa et al., 1986, M.Henry et al., 1995). Дана пара праймерів використовується дослідниками і на сьогоднішній день (ОЕРР/ЕРРО, 2006, Kilic, Yardimci, 2012, Shahnejat-Bushehri et al., 2006). Morris і Henry розробили дизайн 3-х праймерів для проведення гніздової ЗТ-ПЛР також на основі сиквенсу англійського ізоляту для доповнення внутрішнього сиквенсу ампліфікованого фрагменту розміром 500 п.н. протягом першого раунду ЗТ-ПЛР:

Rhzn17 Reverse¹⁷⁰⁰5'-GACGAAAGAGCAGCCATAGC-3¹⁶⁸¹, Rhzn16

Reverse¹⁶⁹²5'-AGCAGCCATAGCAACAGCTG-3¹⁶⁷⁴, Rhzn15 Forward¹³⁷⁵5'-ATAGAGCTGTTAGAGTCACC-3¹³⁹⁴.

При проведенні ПЛР з парою праймерів Rhzn15 і Rhzn16 утворюється продукт ампліфікації розміром 318 п.н., Rhzn15 і Rhzn17 – 326 п.н. (Morris et al., 2001). Дизайн праймерів з розміром продукту ампліфікації 500 п.н. був здійснений на основі сиквенсу лише одного ізоляту у 1986 році.

Методи, які базуються на ампліфікації нуклеїнових кислот збільшують чутливість аналізу, порівняно з серологічними методами, і створюють передумови для якісної, надійної, швидкої діагностики та ідентифікації ВНПЖБ. Створення універсальної діагностичної тест-системи передбачає аналіз максимальної можливої кількості нуклеотидних послідовностей ізолятів ВНПЖБ, оскільки кожен окремий ізолят має власні генетичні особливості, які при розробці тест-систем слід враховувати.

Метою досліджень було провести моніторинг ВНПЖБ на території України, розробити біотехнологічні прийоми молекулярно-біологічної діагностики та ідентифікації ВНПЖБ методом ПЛР, провести оптимізацію параметрів ампліфікації.

Матеріали і методи досліджень. Дослідження проводили на коренеплодах цукрового буряку, відібраних в різних кліматичних зонах України.

Імуноферментний аналіз проводили з використанням неконкурентного сандвіч-методу і поліклональних антитіл комерційного набору (Sediag, Франція) згідно рекомендацій виробника. Показники оптичної густини реєстрували за довжини хвилі 405 нм через кожні 30 хв протягом 3 год. (рис. 1.)

Для пошуку нуклеотидних послідовностей гену та проведення біоінформативного аналізу використано базу даних NCBI (National Center for Biotechnological Information). Біоінформативний аналіз геномів проводили, використовуючи програмне забезпечення «MultAline» (Multiple sequence alignment). Дизайн праймерів розробляли, використовуючи програмне забезпечення «Primer3».

Екстракцію сумарної РНК проводили за стандартною методикою. На останньому етапі сумарну РНК розчиняли в 50 мкл DEPC. Зразки РНК зберігали при -20 °С. Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою

комерційного набору «Реверта-L-100» згідно рекомендацій (AmpliSens, Росія).

ПЛР проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems) у реакційній суміші об'ємом 15 мкл, яка містила 1x ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTPs) (AmpliSens, Росія), 5 пмоль специфічних олігонуклеотидних праймерів, 10-50 нг кДНК, 0,5 U Taq полімерази (AmpliSens, Росія). ПЛР проводили за наступних умов: початкова денатурація 5 хв – 94 °С; тридцять циклів: денатурація 30 с – 94 °С; гібридизація праймерів 30 с – 60 °С; елонгація 30 с – 72 °С.

Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі, який готували, використовуючи TBE буфер з концентрацією 0,5 мг/мл броміду етидію. По завершенні електрофорезу гель забарвлювали 1% розчином бромового етидію, візуалізували за допомогою УФ транслюмінатору.

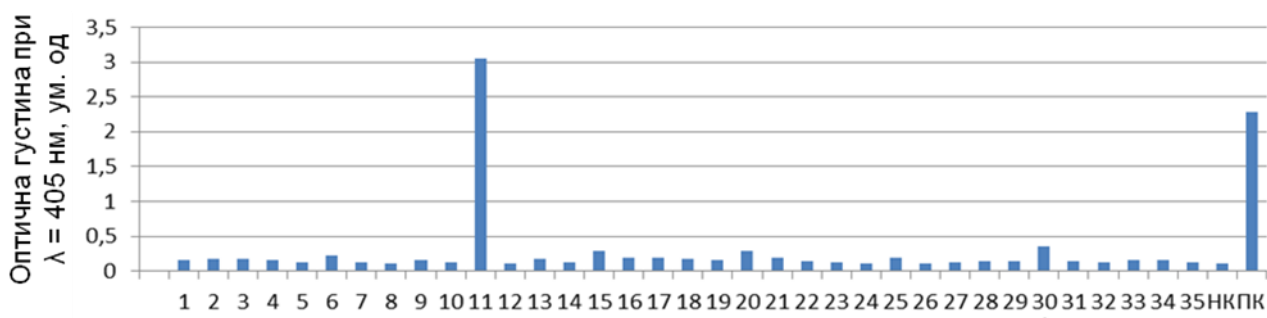


Рис. 1. Діаграма імуноферментного аналізу зразків цукрових буряків відібраних в різних областях України.

Чернівецька (1 – Заставнівський район), Черкаська (2 – Маньківський, 3 – Корсунь–Шевченківський, 4 – Золотоніський, 5 – Уманський райони), Чернігівська (6 – Бобровицький, 7 – Прилуцький, 8 – Ічнянський, 9 – Носівський райони), Хмельницька (10 – Красилівський, 11 – Чемеровецький, 12 – Старокостянтинівський, 13 – Старосинявський райони), Тернопільська (14 – Гусятинський, 15 – Залищицький, 16 – Теребовлянський, 17 – Бучацький, 18 – Чортківський райони), Вінницька (19 – Барський, 20 – Тростянецький, 21 – Томашпільський, 22 – Хмельницький райони), Житомирська (23 – Попільнянський, 24 – Андрушівський, 25 – Бердичівський, 26 – Житомирський райони), Рівненська (27 – Острозький, 28 – Рівненський, 29 – Гоцанський, 30 – Радивилівський, 31 – Дубенський райони), Київська (32 – Васильківський, 33 – Згурівський, 34 – Баршівський, 35 – Яготинський райони) PREGIONK – позитивний контроль; НК – негативний контроль.

Fig 1. ELISA sugar beet samples taken from different regions of Ukraine.

Chernivetska oblast (1 – Zastavnivsky region), Cherkaska oblast (2 – Mankivsky region, 3 – Korsun–Shevchenky region, 4 – Zolotonosky region, 5 – Umansky region), Chernihivska oblast (6 – Bobrovitsky region, 7 – Prilutsky region, 8 – Ichnyansky region, 9 – Nosovsky region), Khmelnytska oblast (10 – Krasylivsky region, 11 – Chemerovetsky region, 12 – Starokonstantinovsky region, 13 – Starosyniavsky region), Ternopiliska oblast (14 – Husyatynsky region, 15 – Zalishchyky region, 16 – Terebovlyansky region, 17 – Buchatskiy region, 18 – Chertkovsky region), Vinnitska oblast (19 – Barsky area, 20 – Trostianetsky region, 21 – Tomashpilsky area, 22 – Khmelnitsky region), Zhytomyrska oblast (23 – Popelnyansky region, 24 – Andrushevsky region, 25 – Berdichevsky region, 26 – Zhitomirsky region), Rivnenska oblast (27 – Ostrozky region, 28 – Rivnensky region, 29 – Goshchansky region, 30 – Radivilovsky region, 31 – Dubensky region), Kievska oblast (32 – Vasilkovsky region, 33 – Zgurovsky region, 34 – Baryshivka region, 35 – Yagotytsky region), HK – positive control; ПК – negative control.

Таблиця
Характеристики створених праймерів

Table
Characteristics of designed primers

Положення на матриці	Нуклеотидна послідовність 5'-3'	Довжина, нуклеотидів	Температура гібридизації, °C	GC-склад, %	Розмір продукту, п.н.
Forward	TTCCGGACGTCGTGAGTGTТА	20	60,30	50,00	419
Reverse	CCCGAGTCCACATТААТТСС	20	59,24	50,00	

Результати та їх обговорення. Проведено скринінг посівів цукрових буряків в різних регіонах України на предмет ураження ВНПЖБ. Відібрано зразки коренеплодів з різних районів Чернівецької, Черкаської, Чернігівської, Хмельницької, Тернопільської, Вінницької, Житомирської, Рівненської, Київської областей. Методом ІФА встановлено наявність ВНПЖБ в зразках коренеплодів цукрового буряку, відібраних в Чемеровецькому районі Хмельницької області (Рис.1).

Для дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей ВНПЖБ, проведено біоінформативний аналіз, який включав скринінг послідовностей генів ВНПЖБ, що кодують білок оболонки. Для біоінформативного аналізу використано 25 повнорозмірних нуклеотидних послідовностей гену, що кодує білок оболонки ВНПЖБ. Нуклеотидні послідовності з генетичного банку обрані таким чином, щоб охопити якомога ширший ареал розповсюдження вірусів у кожному конкретному випадку. Вони представлені послідовностями з наступними номерами у системі даних генетичних послідовностей (GenBank): EU330451.1 Німеччина, AY920465.1 Сербія, D84411.1 Японія, NM117903.1 Франція, AF197556.1 Казахстан, X04197.1, S71490.1 Китай, U25668.1 Китай, AY771348.1 США, AY696114.1 Іспанія, AY696076.1 США, AY696073.1 США, AJ634739.1 Бельгія, AY771347.1 США, AY696089.1 Франція, AV563010.1 Італія, AV018621.1 Японія, EF473096.1 Китай, JF910100.1 Казахстан, AY696084.1 Франція, AV018626.1 Японія, AJ634734.1 Бельгія, AY696091.1 Франція, AY696098.1 Бельгія, EU785962.1 Польща (рис. 2.).

На підставі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей вірусних геномів виявлено специфічні консервативні нуклеотидні послідовності, які використано як матриці для олігонуклеотидних праймерів у процесі синтезу вірусспецифічних фрагментів нуклеїнових кислот. Використовуючи консенсусну

нуклеотидну послідовність гену, що кодує білок оболонки ВНПЖБ створено праймери з оптимальними параметрами:

Forward: 5'-TTCCGGACGTCGTGAGTGTТА-3', Reverse: 5'-CCCGAGTCCACATТААТТСС-3' з утворенням продукту ампліфікації розміром 419 п.н (табл.).

Для екстракції РНК використовували бічні корінці коренеплодів. З сумарної РНК методом зворотної транскрипції отримували кДНК. При проведенні ПЛР аналізу зразків цукрових буряків, у яких попередньо методом ІФА встановлено наявність вірусної інфекції, показано наявність смуг ампліфікації очікуваного розміру 419 п.н.

Далі було проведено оптимізацію параметрів ПЛР за температурними показниками гібридизації праймерів в межах 54 °C - 62 °C. Встановлено що температура в досліджуваному діапазоні не впливала на результати реакції ампліфікації (рис. 3).

Оптимальна концентрація іонів магнію для ефективної роботи ферменту Taq-полімерази при якій не спостерігалася наявність неспецифічних смуг ампліконів і відмічався найвищий вихід продуктів ампліфікації становила 2,5 мМ (рис.4).

Висновки. Проведено агроекологічний моніторинг розповсюдження ВНПЖБ на території України методом ІФА. Створено діагностичну тест-систему для діагностики та ідентифікації ВНПЖБ на основі методу ПЛР. Проведено лабораторне випробування створеної діагностичної тест-систем та підтверджена ефективність її роботи, що відкриває можливості для широкого впровадження ПЛР діагностикуму у лабораторну практику при проведенні фітосанітарного та карантинного контролю в процесі вирощування цукрових буряків. Оптимізовано умови проведення ПЛР аналізу та встановлено, що температура гібридизації праймерів в межах 54 °C - 62 °C не впливала на вихід продуктів ампліфікації, а найвища концентрація ампліконів була зареєстрована за концентрації іонів магнію 2,5 мМ.


```

:473096.1 .....
/696084.1 .....T.....T.....T.....
J785962.1 .....T.....T.....T.....
/696091.1 .....T.....T.....T.....
/696098.1 .....T.....T.....T.....
:018626.1 .....A.....T.....T.....
:910100.1 .....
nsensus GCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGGAAATCTATATAATAAAACCTGTTGGCAGGATTAGGCTCGGGTTGGaCTGACAATAATCCTTTTGTGTCGCCGATGACCCGGTTTCCACAGACACTAACT
391 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
J330451.1 .....C.....C.....C.....
/920465.1 .....C.....C.....C.....
D84411.1 .....C.....C.....C.....
/117903.1 .....A.....A.....A.....C.....
X04197.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
:197556.1 .....A.....A.....A.....C.....
/634739.1 .....C.....C.....C.....A.....
/634734.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
S71490.1 .....S71490.1.....A.....A.....C.....
U25668.1 .....U25668.1.....A.....A.....C.....
/771348.1 .....C.....C.....C.....C.....
/696114.1 .....C.....C.....C.....C.....
/696076.1 .....C.....C.....C.....C.....
/696073.1 .....C.....C.....C.....C.....
3563010.1 .....C.....C.....C.....C.....
/771347.1 .....C.....C.....C.....C.....
/696089.1 .....C.....C.....C.....C.....
:018621.1 .....C.....C.....C.....C.....
:473096.1 .....C.....C.....C.....C.....
/696084.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
J785962.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
/696091.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
/696098.1 .....T.....A.....A.....A.....A.....
:018626.1 .....T.....G.....A.....A.....A.....
:910100.1 .....
nsensus ATGTACGGTGCACCTTGTATATGTTAATCTGTCTGACCCAGAAATTTGCGTTGATAAGTAACTTAAGTAAAGTACTTTAACTGATTCAGGTTAGCAGATAATGCATCTGCTAAATGTGCGTAGAGATGTGG
521 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650
|-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----|
J330451.1 .....
/920465.1 .....
D84411.1 .....
/117903.1 .....
X04197.1 .....T.....T.....C.....T.....C.....A.....A.....C.....
:197556.1 .....
/634739.1 .....
/634734.1 .....T.....T.....C.....T.....C.....A.....A.....C.....
S71490.1 .....C.....C.....C.....C.....
U25668.1 .....C.....C.....C.....C.....
/771348.1 .....
/696114.1 .....
/696076.1 .....

```

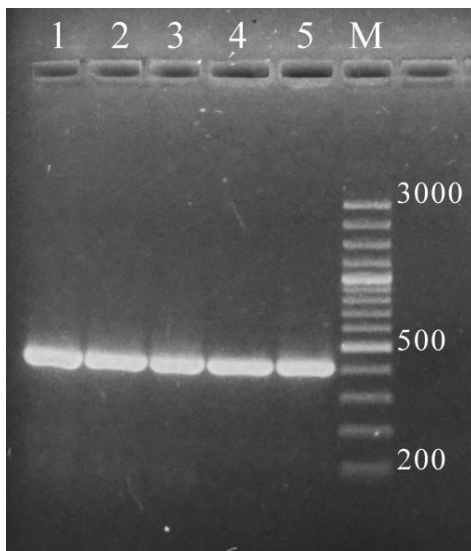



Рис. 3. Електрофореграма ПЛР аналізу ВНПЖБ з різними температурами гібридизації праймерів.

Примітка: 1 – 54 °С, 2 – 56 °С, 3 – 58 °С, 4 – 60 °С, 5 – 62 °С, М – маркер молекулярної ваги (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM0321).

Fig.3. The electrophoregram of PCR analysis of BNYVV with different temperatures of primers hybridization

Note: 1 – 54 °C, 2 – 56 °C, 3 – 58 °C, 4 – 60 °C, 5 – 62 °C, M (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – marker lengths of fragments (base pairs)

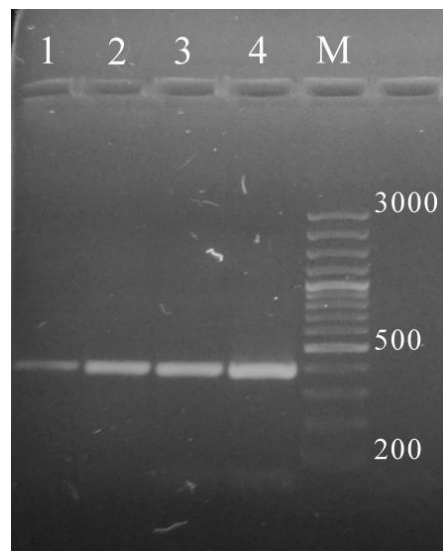


Рис.4. Електрофореграма ПЛР аналізу ВНПЖБ з різними концентраціями іонів магнію в реакційній суміші:

Примітка: 1 – 1,3 мМ, 2 – 1,8 мМ, 3 – 2,0 мМ, 4 – 2,5 мМ, М – маркер молекулярної ваги (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM0321).

Fig.4. The electrophoregram of PCR analysis of BNYVV with different concentration of Mg⁺² ions

Note: 1 – 1,3 мМ, 2 – 1,8 мМ, 3 – 2,0 мМ, 4 – 2,5 мМ, M (GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241) – marker lengths of fragments (base pairs)

Список літератури:

1. Beet necrotic yellow vein virus (benyvirus). // European and Mediterranean Plant protection organization (OEPP/EPPO). – 2006. – P. 429–440.
2. Detection of beet necrotic yellow vein virus using reverse transcription and polymerase chain reaction / C. M.Henry, I. Barker, J. Morris, S. A. Hugo. // Journal of Virological Methods. – 1995. – №54. – P. 15–18.
3. Development of a highly sensitive nested RT-PCR method for beet necrotic yellow vein virus detection / [J. Morris, G. G. Clover, V. A. Harju et al.]. // Journal of Virological Methods. – 2001. – №95. – P. 163–169.
4. Kilic H. C. Nested RT-PCR and immunocapture RT-PCR for detection of beet necrotic yellow vein virus on sugar beet in lake district of Turkey / H. C. Kilic, N. Yardimci. // Romanian agricultural research. – 2012. – №29. – P. 333–337.
5. Koenig R. Beet necrotic yellow vein virus. CMI / R. Koenig, T. Tamada AAB Descriptions of Plant viruses, 2000. – №144.
6. Nucleotide Sequence of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-2 / [S. Bouzoubaa, V. Ziegler, D. Beck et al.]. // J. gen. Virol. – 1986. – №67. – P. 1689–1700.
7. Shahnejat-Bushehri A. Detection of beet necrotic yellow vein virus with reverse transcription-Polymerase chain reaction / A. Shahnejat-Bushehri, J. Adel, M. Dehkordi. // Int. J. Agri. Biol.. – 2006. – №8. – P. 280–285.
8. Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses, 1975. – №144.

THE DEVELOPMENT OF PCR SYSTEM FOR IDENTIFICATION OF BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS AND MONITORING IN UKRAINE

K. Grinchuk, I. Antipov, M. Ermolaev

The ELISA screening of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in agrocenoses of Ukraine (Western and Central Ukraine) was performed and the presence of BNYVV was shown in samples of roots of sugar beet plants selected in Chemerovetsky region of Khmelnytskyi oblast. The bioinformative analysis of nucleotide sequences of isolates of BNYVV deposited in genetic databank was made. The conserved gene sequence encoding coat protein was established and specific primers for nucleotide sequences of the genome of the BNYVV were developed. The specific oligonucleotide primers were synthesized. The laboratory testing of synthesized primers and the optimization of polymerase chain reaction were made. The optimum temperature of primers hybridization was 54 °C - 62 °C and the highest production of amplicons was registered by the concentration of Mg⁺² was 2,5 mM.

Keywords: diagnostics, PCR, beet necrotic yellow vein virus.

Одержано редколегією 13.02.2015