

ВІРУС НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ

жилок буряку: ПЛР-діагностика та ідентифікація українського ізоляту

Розроблено тест-систему на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для ідентифікації РНК-5 вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ) та встановлено, що на території України циркулює ізолят, який містить 4 сегменти РНК: РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. Розроблено ПЛР-систему одночасного виявлення сегментів РНК геному ВНПЖБ.

вірус некротичного пожовтіння жилок буряку, діагностика, ПЛР

На території України циркулює вірус некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ), який входить до списку «Карантинних організмів, обмежено розповсюджених на території України» і викликає ризоманію — хворобу цукрових буряків [1, 2].

Геном ВНПЖБ представлений чотирма сегментами одноланцюгової (+) РНК. РНК-5 в геномі ВНПЖБ встановлено в ізолятах, виділених в Китаї, Японії, Франції, Казахстані, Великобританії, рідше — на території Німеччини [7, 8].

РНК-1 містить одну відкриту рамку читування (ВРЗ), яка транслюється з утворенням поліпротеїну 237 кДа (Р237). РНК-2 містить ВРЗ, що кодує білки 75 кДа, 42 кДа, 13 кДа, 15 кДа, 14 кДа [6]. РНК-3 кодує протеїн 25 кДа [9]. РНК-4 кодує протеїн 31 кДа, що має важливе значення для передачі вірусу вектором *Polytuxa betae* [11].

РНК-5 кодує протеїн масою 26 кДа (Р26). За наявності в геномі РНК-5 ВНПЖБ викликає більш суворі симптоми ураження і здатний



К.В. ГРИНЧУК, аспірант,
І.О. АНТИПОВ,
кандидат сільськогосподарських наук
Національний університет біоресурсів
і природокористування України
М.В. ЄРМОЛАЄВ,
провідний фахівець сектору вірусології,
Державна установа «Центральна
фітосанітарна лабораторія»

інфікувати частково стійкі проти вірусу сорти рослин цукрових буряків [3].

Для недопущення розповсюдження ВНПЖБ необхідно здійснювати своєчасну діагностику.

Мета роботи — розробити тест-систему для ідентифікації РНК-5, встановити склад РНК сегментів геному українського ізоляту ВНПЖБ, який попередньо було ідентифіковано в Чемеровецькому районі Хмельницької області.

Матеріали та методи досліджень. Для пошуку нуклеотидних послідовностей РНК-5 та проведення біоінформативного аналізу було використано базу даних NCBI [5]. Біоінформативний аналіз геномів проводили, використовуючи програмне забезпечення «MultAlin» [4]. Дизайн праймерів розробляли, використовуючи програмне забезпечення «Primer3» [9].

Екстракцію РНК здійснювали з використанням комерційного набору «РИБО-Сорб» (AmpliSens, Росія), реакцію зворотної транскрипції —

за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» (AmpliSens, Росія), згідно з рекомендаціями виробника.

Реакційна суміш для ПЛР, об'ємом 15 мкл, містила: 1 × ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl₂ (AmpliSens, Росія), 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (AmpliSens, Росія), 5 пмоль кожного з праймерів, 10—40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полімерази (AmpliSens, Росія). ПЛР проводили з використанням кДНК українського ізоляту ВНПЖБ.

Ампліфікацію проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01. Продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, який готували, використовуючи ТВЕ буфер з концентрацією 0,5 мг/мл броміду етидію.

Результати досліджень. Для створення дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей геному ВНПЖБ, проведено біоінформативний аналіз гена Р26 РНК-5. На підставі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей геномів виявили специфічні консервативні нуклеотидні послідовності гена Р26, які використали як матриці для олігонуклеотидних затравок (рис. 2). На матриці консенсусної послідовності гена Р26 створено дизайн праймерів з оптимальними характеристиками: Р26-F 5'-АТАТГТGGCTTGTGTT-GCTAGT-3', Р26-R 5'-САСАG-GTCGTTGCCAAATCT-3'. Розрахункова оптимальна температура відпаду становить для Р26-F — 58,04°C, а для Р26-R — 59,39°C. Розмір продукту ампліфікації становить 100 п.н.

ПЛР проводили з використанням кДНК українського ізоляту ВНПЖБ за наступних умов: початкова денатурація 5 хв — 94°C; 30 циклів: денатурація 30 с — 94°C, відпал праймерів 30 с — 60°C, елонгація 30 с — 72°C, заключний синтез 72°C — 7 хв. Використовували послідовності праймерів, які були раніше нами розроблені. РНК-1 Forward 5'-AGCGGAATCAGTGG-



Рис. 1. Симптоми ураження ВНПЖБ на листках та коренеплодах рослин цукрового буряку [1]

CAAGAA-3', Reverse 5'-ACCATC-ATCGCCCTTCATGG-3', РНК-2 Forward 5'-CTTTGGCAGGATT-AGGCTCG-3', Reverse 5'-CAC-TCGGGACTATCACCAGG-3', РНК-3 Forward 5'- TGTGGGTT-TCGTGCCTTATG-3', Reverse 5'-CGTCAGGGGCTTGAA-TAACATT-3', РНК-4 Forward 5'-GC-TAGGATGGTGCAGAAACG-3', Reverse 5'-ATCACAAAACSTT-CGCCACC-3'. Розмір продуктів ампліфікації становить: РНК-1 — 803 п.н., РНК-2 — 490 п.н., РНК-3 — 424 п.н., РНК-4 — 693 п.н., РНК-5 — 100 п.н. В результаті проведення ПЛР-аналізу виявлено присутність в геномі українського ізоляту ВНПЖБ протеїнів: РНК-1 (P237), РНК-2 (P75), РНК-3 (P25), РНК-4 (P31), РНК-5 (P26) — відсутня (рис. 3).

Також нами здійснено мультиплексну реакцію з використанням п'яти пар праймерів. Реакцію проводили за температури відпалу праймерів 60°C, що є оптимальною для всіх використаних пар праймерів.

На електрофореграмі зафіксовано 4 продукти ампліфікації, що відповідають очікуванню (рис. 4). Неспецифічних продуктів реакції не спостерігалось. Показано можливість постановки реакції на виявлення одночасно кількох сегментів РНК. Це дає можливість знизити собівартість ПЛР-аналізу та зменшити витрати часу на його проведення.

ВИСНОВКИ

Розроблено системи аналізу генома ВНПЖБ та встановлено, що український ізолят ВНПЖБ містить 4 сегменти РНК: РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. РНК-5 в геномі ВНПЖБ не виявлено. Проведено мультиплексний ПЛР-аналіз. Показано, що концентрація фрагментів генома, що кодує білок Р75 в уражених рослинах, найвища, оскільки на електрофореграмі спостерігається найбільший вихід продукту ампліфікації. Для діагностики ВНПЖБ рекомендовано використовувати систему, яка заснована на використанні праймерів специфічних до гена Р75 сегменту РНК-2.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ризоманія (вірус некротичного пожелтіння жилок буряку) [Електронний ресурс] // Державна фітосанітарна інспекція Рівненської області — Режим доступу до ресурсу: <http://rivne-karantyn.com.ua/pests/detail.php?ID=83>.
2. Савчук О. Ризоманія — опасная вирусная болезнь сахарной свеклы [Електронний ресурс] / О. Савчук // Журнал Зерно —

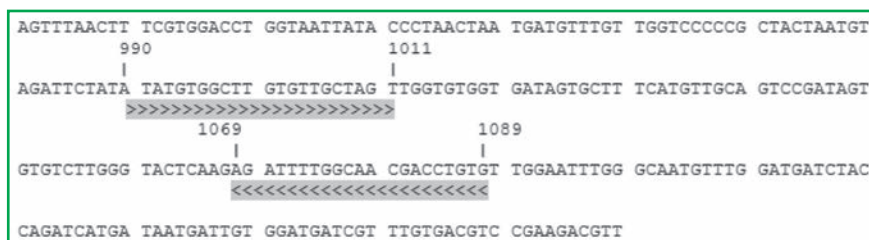


Рис. 2. Локалізація місць гібридизації праймерів на ДНК матриці консенсусної послідовності гена P26

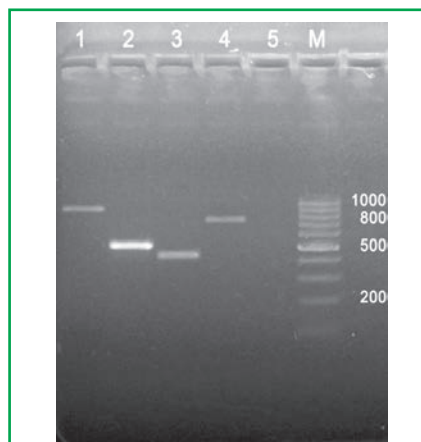


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу сегментів РНК ВНПЖБ: 1 — РНК-1 (P237), 2 — РНК-2 (P75), 3 — РНК-3 (P26), 4 — РНК-4 (P31), 5 — РНК-5 (P25), М — маркер довжин фрагментів GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241 (пар нуклеотидів)

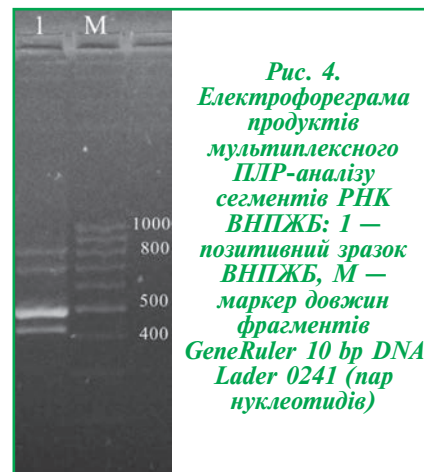


Рис. 4. Електрофореграма продуктів мультиплексного ПЛР-аналізу сегментів РНК ВНПЖБ: 1 — позитивний зразок ВНПЖБ, М — маркер довжин фрагментів GeneRuler 10 bp DNA Lader 0241 (пар нуклеотидів)

2007. — №1. — Режим доступу до ресурсу: <http://pesticidov.net/ru/articles/pesticidi/4405/>

3. Koenig R. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in a sugarbeet growing area in Europe / R. Koenig, A. Haerberle, U. Commandeur // Archives of Virology. — 1997. — №142. — P. 1499—1504.
4. Multiple sequence alignment by Florence Corpet [Електронний ресурс] — Режим доступу до ресурсу: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>
5. National Center for Biotechnology Information [Електронний ресурс] — Режим доступу до ресурсу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
6. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1 / [S. Bouzoubaa, L. Quillet, H. Guillely et al.]. // Journal of General Virology. — 1987. — № 68. — P. 615—626.
7. Pavli O.I. Molecular characterization of beef necrotic yellow vein virus in Greece and transgenic approaches towards enhancing rhizomania disease resistance: dissert. of doctor of agricultural sciences / O.I. Pavli — Wageningen, 2010. — P. 166.
8. Pferdmenges F. Occurrence, spread and pathogenicity of different Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) isolates: dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften / Pferdmenges Friederike — Göttingen, 2007. — S. 111.
9. Primer3web version 4.0.0 — Pick primers from a DNA sequence. [Електронний ресурс] — Режим доступу до ресурсу: <http://primer3.ut.ee/>.
10. Production and Pathogenicity of Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Numbers of RNA Components / [T. Tamada,

Y. Shirako, H. Abe et al.] // Journal of General Virology. — 1989. — №70. — P. 3399—3409.

11. RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots / [M.D. Rahim, I.B. Andika, Ch. Han et al.]. // Journal of General Virology. — 2007. — № 88. — P. 1611—1619.

Гринчук К.В., Антипов І.А., Ермолаєв М.В.

Вірус некротического пожелтіння жилок свеклы, ПЦР-діагностика і ідентифікація українського ізоляту

Разроботана тест-система на основі полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації РНК-5 вірусу некротического пожелтіння жилок свеклы (ВНПЖС) і установленно, що на території України циркулює ізолят, імеючий 4 сегмента РНК: РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. Разроботана ПЦР система одночасного виявлення сегментів РНК генома ВНПЖС.

вірус некротического пожелтіння жилок свеклы, диагностика, ПЦР

Hrinchuk K.V., Antypov I.A., Yermolaev M.V.

Virus necrotic yellowing of beet veins, PCR-diagnostics and identification of isolate of Ukraine

It was developed the test system based on polymerase chain reaction for detection of RNA-5 of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV). It was established that the Ukrainian isolate contains 4 segments of RNA: RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4. It was developed the system simultaneous detection of PCR segments of BNYVV genome.

necrotic yellowing of beet veins, diagnostic, PCR

Рецензент:

Кирик М.М., доктор біологічних наук, професор, академік НААН