

РОЗРОБКА ПЛР-СИСТЕМ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ ЗВИЧАЙНОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ (*Bean common mosaic virus*)

І. О. АНТИПОВ, кандидат сільськогосподарських наук,

К. В. ГРИНЧУК, асистент,

О. Т. ДУПЛЯК, кандидат сільськогосподарських наук

**Національний університет біоресурсів і природокористування
України**

E-mail: antigav@rambler.ru

Анотація. Проведено моніторинг посівів рослин квасолі в ВП НУБіП України «Агрономічна дослідна станція» та відібрано рослини з симптомами ураження вірусом звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК), які було використано як позитивний контроль для випробовування систем ідентифікації ВЗМК на основі полімеразної ланцюгової реакції. Проведено дизайн праймерів для ідентифікації фрагмента нуклеотидної послідовності, що кодує ген білка оболонки ВЗМК з такими нуклеотидними послідовностями: прямий праймер 5'-ttcggacgctcgtgagtgta-3' та зворотний 5'-cccgagtccacattaattcc-3', розмір продукту ампліфікації становив 391 п.н. Виконано лабораторне випробування розроблених систем. Установлено, що рекомендована концентрація іонів Mg^{2+} у реакційній суміші становить 1,8мМ, а температура відпалу праймерів у межах 54-62°C не впливає на вихід продуктів ампліфікації.

Ключові слова: ідентифікація, полімеразна ланцюгова реакція, вірус звичайної мозаїки квасолі.

Актуальність. Вірусні хвороби досить поширені у всьому світі. Іноді вони виникають як епізодичні спалахи, а іноді як спустошувальні епіфітотії, які призводять до значних втрат врожаю [1, 6]. Однією з головних причин зменшення врожаю внаслідок ураження вірусними хворобами є недостатнє їх вивчення та відсутність надійних засобів боротьби з вірусними інфекціями. Лише своєчасна ідентифікація вірусу в посівному матеріалі або безпосередньо в агроценозах може сприяти збереженню врожаю для попередження його розповсюдження. Відомо, що діагностика за зовнішніми ознаками не гарантує правильності висновків про ураження тієї чи іншої культури і щоб ідентифікувати хворобу точно, необхідно використовувати комплекс методів діагностики: метод рослин-індикаторів (біотестування), серологічні методи діагностики, метод електронної мікроскопії та молекулярно-біологічні методи дослідження [2, 3, 6, 7]. Бобові культури мають

велике значення в сільськогосподарському секторі всього світу, оскільки із сої та квасолі одержують цінні харчові продукти, які є джерелом білка [3], але значної шкоди врожаю завдають вірусні захворювання.

Мета дослідження полягала в розробленні ПЛР тест-системи для ідентифікації ВЗМК, пошуку позитивного зразка для апробації системи та оптимізації проведення аналізу.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом для проведення аналізу були листки рослин квасолі звичайної (*Phaseolus vulgaris* L.) із симптомами ураження вірусом звичайної мозаїки квасолі, відібрані під час вегетації в НДГ НУБіП України «Агрономічна дослідна станція». Для пошуку нуклеотидних послідовностей, які кодують ген оболонки (БО) ВЗМК та проведення біоінформативного аналізу було використано базу даних NCBI (National Center for Biotechnological Information) [8]. Біоінформативний аналіз проводили, використовуючи програмне забезпечення «MultAlin» (Multiple sequence alignment) [6]. Дизайн праймерів розробляли, використовуючи програмне забезпечення «Primer3» [7].

Екстрагували РНК з використанням комерційного набору «РИБО-Сорб» (AmpliSens, Росія), реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» (AmpliSens, Росія), згідно з рекомендаціями виробника.

Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 15мкл містила: 1×ПЛР буфер (Росія, АмплиСенс) з такими варіантами концентрацій іонів магнію (Росія, АмплиСенс): 1,3мМ, 1,8мМ, 2,0мМ, 2,5мМ $MgCl_2$, 0,2мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (Росія, АмплиСенс), 5пкмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10-40нг матричної ДНК, 0,5U Таq-полімерази (Росія, АмплиСенс).

Реакційна суміш для проведення полімеразної ланцюгової реакції об'ємом 15мкл містила: 1×ПЛР буфер з 1,5мМ $MgCl_2$ (AmpliSens, Росія), 0,2мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (AmpliSens, Росія), 1пкмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10-40нг кДНК, 0,5U Таq-полімерази (AmpliSens, Росія). Умови проведення ПЛР: початкова денатурація 94°C – 5хв; 35 циклів денатурації: 94°C – 30с, температура відпалу праймерів встановлювали в межах 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C – 30с, синтез 72°C – 30с, заключний синтез 72°C – 7хв. Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01.

Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі, який готували, використовуючи ТВЕ-буфер із концентрацією 0,5мкг/мл броміду етидію. Результати ПЛР візуалізували УФ-промінням транслюмінатора (Т-312-С), фотографували цифровим фотоапаратом «Sony» (DSLR-A500).

Результати дослідження та їх обговорення. Під час проведення скринінгу посівів кvasолі звичайної на предмет виявлення ВЗМК спостерігали зміни морфології листкової пластини, що характеризувалася хвилястістю краю листка, деформацією листкової пластини та чергуванням світло-зелених ділянок листка з темно-зеленими, іноді спостерігалися некрози, деякі рослини відставали у рості (рис. 1).



Рис. 1. Рослина кvasолі сорту Благодать із симптомами ураження ВЗМК

Результати візуального обстеження посівів кvasолі звичайної в НДГ «Агрономічна дослідна станція» НУБіП України наведено в таблиці 1.

Відібрано рослини із симптомами та без симптомів вірусного ураження. Екстраговано тотальну РНК з досліджуваних зразків рослин кvasолі. Отримано комплементарну ДНК, яку зберігали за температури -20°C .

Для створення дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей гена, який кодує білок оболонки ВЗМК, проведено біоінформативний аналіз консервативних послідовностей гена, що кодує білок оболонки вірусу, використовуючи генетичний банк даних. На підставі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей було виявлено суворо специфічні консервативні нуклеотидні послідовності, які використано як матриці для проведення дизайну праймерів. Аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення «MultAlin» (Multiple sequence alignment).

Використовуючи програмне забезпечення «Primer3», було створено дизайн праймерів. Для синтезу праймери підбирали так, щоб розбіжність температур відпалу обох праймерів була найнижчою. Підібрані праймери перевіряли на можливість утворення шпильок і димерів. Для синтезу обрано пару праймерів: прямий 5'-ttcggacgtcgtgagtggtta-3' та зворотний 5'-cccgagtccacattaattcc-3'. Підібрані праймери не виявляли специфічності до нуклеотидних послідовностей геномів інших організмів з утворенням ПЛР- продукту розміром 391 пар нуклеотидів.

Для пошуку позитивних контролів, використовуючи кДНК відібраних зразків, проведено мультиплексний аналіз із використанням 3 пари праймерів, комплементарних до геномів ВЗМК, вірусу жовтої мозаїки кvasолі та вірусу мозаїки сої.

1. Результати візуального обстеження посівів кvasолі звичайної колекції кафедри селекції та генетики НУБіП України

Ч.ч.	Зразки	Наявність симптомів ВЗМК
1	Первомайська	+
2	IR2195	–
3	IR2133	–
4	Отрада	–
5	Солдатики	+
6	Verdhake	+
7	1681A6	–
8	Лотос	–
9	Златко	–
10	Благодать	–
11	Веселка	+
12	Смерека	–
13	IR2140	+
14	IR1157	–
15	ИД0300498	–

Під час проведення ПЛР-аналізу з кДНК відібраних зразків квасолі звичайної показано наявність смуг ампліфікації розміром 391п.н.. Таким чином підтверджено коректну роботу розробленої тест-системи (рис. 2).

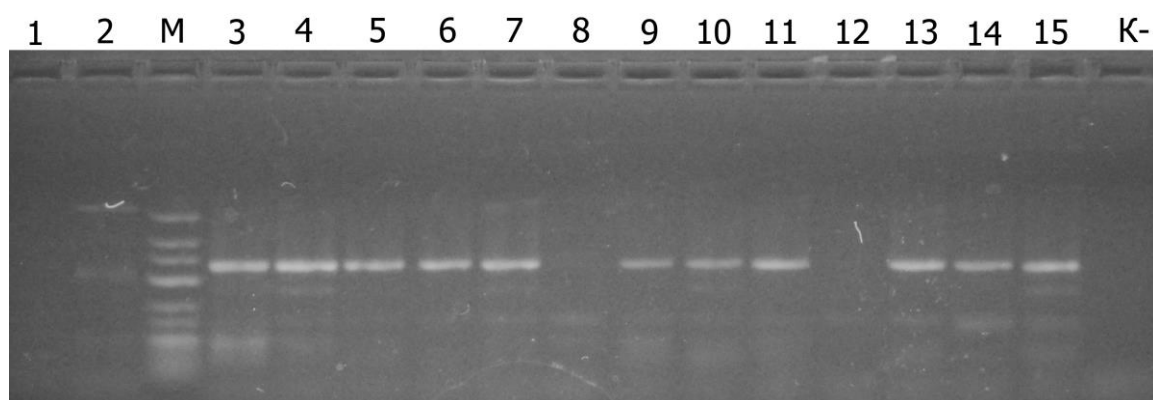


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу ідентифікації ВЗМК у зразках квасолі звичайної, відібраних у НДГ НУБіП України «Агрономічна дослідна станція», М – маркер молекулярної ваги (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM1203), К – негативний контроль

Установлено наявність ВЗМК у зразках: IR2133, Отрада, Солдатики, Verdhake, 1681A6, Златко, Благодать, Веселка, IR2140, IR1157, ИД0300498.

Оптимізацію параметрів ПЛР проводили за температурним режимом.

Установлено, що температура відпалу праймерів у межах 54-62°C не впливала на результати дослідження (рис. 3), неспецифічні смуги ампліконів під час проведення оптимізації температури відпалу не виявлялися.

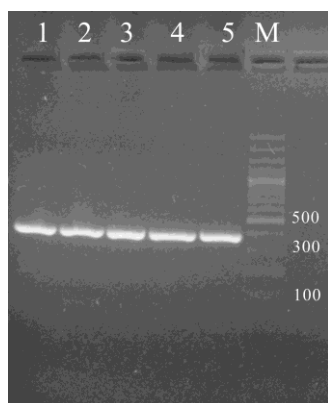


Рис. 3. Електрофореграма зразка квасолі звичайної, ураженої ВЗМК з температурами відпалу праймерів.

1. 54°C, 2. 56°C, 3. 58°C, 4. 60°C, 5. 62°C,
 М – маркер молекулярної ваги (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM 0241)

Висновки і перспективи Створено дизайн олігонуклеотидних праймерів для проведення ПЛР-аналізу з метою ідентифікації ВЗМК. Синтезовано пару праймерів: прямий праймер 5'-ttcggacgtcgtgagtgtta-3' та зворотний 5'-cccgagtcscacattaattcc-3'. Підібрані праймери не виявляли специфічності до нуклеотидних послідовностей геномів інших організмів з утворенням ПЛР-продукту розміром 391 пар нуклеотидів. Температура відпалу праймерів у межах 54-62°C не впливала на результат ампліфікації. Проведено моніторинг на вірусоносійство дослідних ділянок квасолі в умовах НДГ НУБіП України «Агрономічна дослідна станція». Показано наявність ВЗМК у зразках квасолі звичайної: IR 2133, Отрада, Солдатики, Verdhake, 1681A6, Златко, Благодать, Веселка, IR2140, IR1157, ИД0300498.

Список використаних джерел

1. Билай В. И., Гвоздяк Р. И., Скрипаль И. Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / Под ред. Билай В. И. – Киев: Наук. думка. 1988. – 552 с.
2. Бойко А. Л. Основы экологии та біофізики вірусів. К.: Фітосоціоцентр, 2003. – 164 с.
3. Бойко А. Л. Экология вирусом растений. – К.: Вища шк., 1990. – 166 с.
4. Віруси і вірусні хвороби бобових культур / [Московець С. М., Краєв В. Г., Порембська Н. Б., Білик Л. Г. та ін.] – К.: Наук. думка, 1971.– 136 с.
5. Вірусні та мікоплазмові хвороби польових культур / [Шевченко Ж. П., Хельман Л. В., Недвига О. Є., Онищенко А. М. та ін.] – К.: Урожай, 1995.– 304с.
6. Вірусні хвороби сільськогосподарських культур / [Московець С. Н., Бобырь А. Д., Глушак Л. Е., Онищенко А. Н.] – К.: Урожай, 1975.–152 с.
7. Вірусні хвороби рослин / [Московець С. М.] – Київ.: Знання, 1971.–30с.
8. Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses / [Fauquet C. M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L. A.]; In: C.M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball. – [The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (book)]. – San Diego, CA. USA.: Elsevier Academic Press, 2005.–P.1162.
9. Режим доступу: multalin.toulouse.inra.fr/multalin/

10. Режим доступу: primer3.ut.ee/

11. Режим доступу: www.ncbi.nlm.nih.gov/

References

1. Boiko A. L. Osnovy ekolohii ta biofyziky virusiv / Boiko A. L. – K.: Fitosotsiotsentr, 2003. – 164 s.
2. Boyko A. L. Экологія вирусів рослин / Boyko A. L. – K.: Vyshcha shkola, 1990. – 166 s.
3. Vipusy i vipucni khvopoby bobovykh kultup / [Mockovets C. M., Kraiev V. H., Popembcka N. B., Bilyk L. H. ta in.] – K.: Naukova dumka, 1971. – 136 s.
4. Vipucni ta mikoplazmovi khvopoby polovykh kultup / [Shevchenko Zh. P., Khelman L. V., Nedvyha O. Ie. ta in.] – K.: Urozhai, 1975. – 152 s.
5. Vipucni khvopoby silskohospodarckykh kultup / [Moskovets S. N., Bobyr A. D., Hlushak L. E., Onyshchenko A. N.]. – K.: Urozhai, 1975. – 152 s.
6. Микроранізми – возбудителі захворювань рослин / [Bylay V. Y., Hvozdyak R. Y., Skrypal' Y. H. y dr.]; pod red. V. Y. Bylay. – K.: Nauk. dumka, 1988. – 552 s.
7. Mockovets C. M. Vipucni khvopoby poclyn / Mockovets C. M. – K.: Znannia, 1971. – 30 s.
8. Multiple sequence alignment by Florence Corpet [Elektronnyy resurs] – Rezhym dostupu do resursu: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.
9. Multiple sequence alignment by Florence Corpet [Elektronnyy resurs] – Rezhym dostupu do resursu: <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>.
10. National Center for Biotechnology Information [Elektronnyy resurs] – Rezhym dostupu do resursu: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
11. Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / [Fauquet M. C., Mayo M. A., Maniloff J. et al.]. – USA: Elsevier, 2005. – P. 821-822.

РАЗРАБОТКА ПЛР-СИСТЕМ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ОБЫЧНОЙ МОЗАИКИ ФАСОЛИ (*Bean common mosaic virus*)

И. А. Антипов, Е. В. Гринчук, О. Т. Дупляк

Аннотация. Проведен мониторинг насаждений растений фасоли в НИХ НУБиП Украины «Агрономическая исследовательская станция» и отобраны растения с симптомами поражения вирусом обычной мозаики фасоли (ВОМФ), которые были использованы в качестве позитивного контроля для апробации систем идентификации ВОМФ на основе полимеразной цепной реакции. Проведен дизайн праймеров для идентификации фрагмента нуклеотидной последовательности, которая кодирует ген белка оболочки ВОМФ со следующими нуклеотидными последовательностями: прямой праймер 5'-ttcggacgctcgtgagtgtta-3', обратный 5'-cccgagtccacattaattcc-3', размер продукта амплификации составляет

391п.н. Проведена лабораторная апробация разработанных систем. Установлено, что рекомендуемая концентрация ионов магния Mg^{2+} в реакционной смеси составляет 1,8 мМ, а температура отжига праймеров в диапазоне 54-62°C не влияет на выход продуктов амплификации.

Ключевые слова: *идентификация, полимеразная цепная реакция, вирус обычной мозаики фасоли.*

DEVELOPMENT CPD SYSTEMS FOR IDENTIFICATION OF MOSAIC VIRUS ORDINARY BEANS (*Bean common mosaic virus*)

I. Antipov, K. Hrynychuk, O. Duplyak

Abstract. *The plants with symptoms of the bean common mosaic virus (BCMV) in educational and research farm «Agronomic Research Station» of the National university of life and environmental research of Ukraine has been selected and used as positive control for approbation PCR test-systems. Primers design for identification of coat protein of BCMV have been made. Primers were synthesized: Forward 5'-ttcggacgctcgtgagtgtta-3', Reverse 5'-cccgagtcacattaattcc-3' with product amplification 381 b.p. Laboratory research of created PCR diagnostic system has been carried out and the conditions of amplification reaction have been optimized. The recommended concentration of magnesium ions Mg^{2+} in the reaction mixture is 1,8 mM and primers annealing in the range 54-62° C does not affect of amplification products.*

Key words: *identification, polymerase chain reaction, bean common mosaic virus.*