

РОЗРОБКА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНОЇ СИСТЕМИ ПЛР ДІАГНОСТИКИ ВІРОЇДА ВЕРЕТЕНОВИДНОСТІ БУЛЬБ КАРТОПЛІ

І.О. АНТІПОВ, кандидат сільськогосподарських наук

К.В. ГРИНЧУК, аспірантка*

М.Д. МЕЛЬНИЧУК, доктор біологічних наук

Розроблено діагностичну тест-систему на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для діагностики та ідентифікації віроїда веретеновидності бульб картоплі. Проведено лабораторне випробування ПЛР тест-системи та оптимізовано умови проведення реакції ампліфікації.

Діагностика, ПЛР, віроїд веретеновидності бульб картоплі.

Вірусні хвороби картоплі призводять до різкого зниження врожаю і погіршення якості продукції. Віруси картоплі одні з перших були визначені як патогени, що мають важливе економічне значення [1]. Оскільки нині не існує засобів боротьби з вірусними захворюваннями, актуальним залишається питання моніторингу та ідентифікації для запобігання їх розповсюдження [2]. Віроїд веретеновидності бульб картоплі (ВВБК) вперше описаний в 1922 році W.H. Martin в США. В Україні вперше ідентифікований у 1932 році. ВВБК належить до родини *Pospiviroidae*, роду *Pospiviroid*. Віроїд представлений замкнутою одноланцюговою кільцевою молекулою РНК довжиною 356-375 нуклеотидів. Реплікація відбувається в ядрі [9].

Симптоми захворювання залежать від виду рослин, сорту та умов навколишнього середовища [3, 8]. На рослинах картоплі вони такі: для надземної частини рослини характерні прямостоячі тонкі стебла і квітконіжки, які довші ніж у здорових рослин; дрібніші долі листка з хвилястими краями і тенденцією згинатися всередину; гостріші кути між стеблами і живцями; листя поблизу ґрунту помітно коротше і прямостояче, контрастуючи із здоровими рослинами, листки, які лежать на землі, мають темну пластинку [7].

Для діагностики та ідентифікації ВВБК необхідно використовувати комплекс високочутливих специфічних методів. Серологічні методи не застосовуються через відсутність у віроїдів білкової оболонки, або будь-яких специфічних білків і низьких антигенних властивостей РНК [4, 9]. Використання електронної мікроскопії також є не досить ефективним методом діагностики ВВБК [5].

* Науковий керівник – кандидат сільськогосподарських наук, доцент І.А. Антіпов

Для діагностики ВВБК ефективними методами є такі, де як мішень використовується геном віроїда, одним з яких є метод з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що дозволяє збільшити кількість навіть незначних концентрацій специфічних фрагментів нуклеїнових кислот.

Мета досліджень – розробка тест-системи для діагностики віроїда веретеновидності бульб картоплі методом полімеразної ланцюгової реакції та оптимізування умов проведення реакції ампліфікації.

Матеріали та методика досліджень. Матеріалом для проведення аналізу були листки рослин картоплі з симптомами захворювання, відібрані під час вегетації.

Для екстракції сумарної РНК використовували комерційний набір РИБО-сорб-В (AmpliSens, Росія). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору Реверта-Л, (AmpliSens, Росія) згідно з рекомендаціями виробника. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили у реакційній суміші об'ємом 15 мкл. Умови проведення ПЛР: початкова денатурація 94 °С – 5 хв; 35 циклів денатурації: 94 °С – 30 с, відпалу праймерів 55 °С – 30 с, синтезу 72 °С – 30 с, заключний синтез 72 °С – 7 хв. Електрофорез проводили у 1,5 %-ному агарозному гелі, який фарбували бромовим етидієм концентрацією 0,5 мкг/мл, досліджували у променях ультрафіолетового світла.

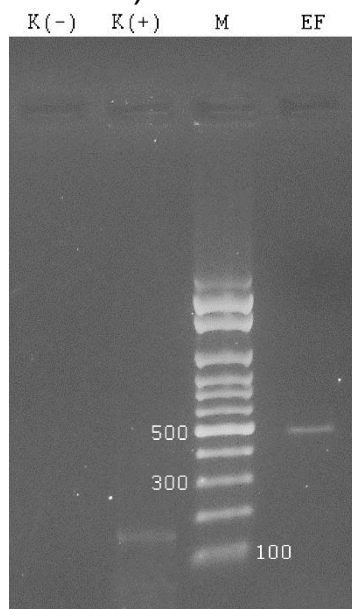
Результати досліджень. На основі консенсусної нуклеотидної послідовності геному віроїда веретеновидності бульб картоплі, використовуючи програмне забезпечення «Primer3», нами створено дизайн праймерів. Майже однакова температура відпалу обох праймерів дозволяє уникнути хибно позитивних результатів у процесі ампліфікації.

Стандартна реакційна суміш для ПЛР об'ємом 15 мкл містила: 1хПЛР буфер з 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (Ампли Сенс), 0,1 мкМ кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10 – 50 нг матричної ДНК, 0,05 У/мкл Таq полімерази (Ампли Сенс).

У результаті проведених досліджень методом ПЛР виявлено присутність в зразках позитивного контролю віроїда веретеновидності бульб картоплі (рисунок). На електрофореграмі чітко видно продукти ампліфікації розміром 150 п.н.

Оскільки на електрофореграмі смуга позитивного контролю досить нечітка, що свідчить про невідповідність умов ампліфікації ПЛР, було проведено оптимізацію розробленої тест-системи для підвищення специфічності зв'язування олігонуклеотидних затравок з ДНК матрицею та покращення умов реакції. Для оптимізації умов полімеразної ланцюгової реакції було змінено два основні параметри: концентрацію іонів магнію та температуру відпалу праймерів на ДНК матриці.

Нами були випробувані температури відпалу від 54 °С до 66 °С. На електрофореграмі найбільш яскрава смуга проявилась при температурі 60 °С, що свідчить про високий вихід основного продукту реакції ампліфікації. Неспецифічні смуги ампліконів під час проведення оптимізації температури відпалу не виявлялися. Фрагмент ДНК, який був синтезований, при температурі 60 °С, відповідав довжині амплікона для цієї пари праймерів (150 п.н.).



Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу визначення віроїда веретеновидності бульб картоплі:

K(-) – негативний контроль; K(+) – позитивний контроль; **EF** – контроль якості виділення РНК та проведення зворотної транскрипції; **(M)** – маркер довжин фрагментів Gene Ruler 0321 (пар нуклеотидів)

Висновки

Розроблено власну тест-систему для діагностики та ідентифікації віроїда веретеновидності бульб картоплі на основі полімеразної ланцюгової реакції, оптимізовано умови проведення ПЛР та встановлено оптимальні показники компонентів реакції та температуру відпалу праймерів для проведення ПЛР аналізу.

Список літератури

1. Вирусные болезни и семеноводство картофеля / [пер. с англ. Т.Н. Теплоуховой]. – М.: Колос, 1976 – 288 с.
2. Диагностика и контроль вириода веретеновидности клубней картофеля / С.М. Мусин, А.В. Бабоша, О.А. Кондакова [и др.] // Защита и карантин растений. – 2001. – № 10. – С. 22 – 23.
3. Московец С.М. Віруси і вірусні хвороби картоплі / Московец С.М., Грама Д.П., Жеребчук Л.К. – К.: Наук. думка., 1973. – 166 с.

4. Чигрин А.В. До питання про готику та вірусне скручування листків картоплі / А.В. Чигрин // Вісник Полтавської держ. агр. академії. "Сільське господарство. Рослинництво". – 2009. – № 4 – С. 64 – 71.
5. Büchen-Osmond C. ICTVdB Virus Descriptions [Електронний ресурс]. – 2002. Режим доступу до журн.: www.ictvdb.iacr.ac.uk/ICTVdB/80010001.htm.
6. Diener T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil / T.O. Diener // Advances in Virus Research. – 2001. – №57. – pp.137 – 184.
7. Hooker W.J. Compendium of Potato Diseases (ed. Hooker W.J.) Potato Spindle Tuber Viroid / W.J. Hooker // American Phytopathological Society. – 1981. – p.121.
8. Owens R.A., Verhoeven J.Th.J. Potato spindle tuber. – 2009. Potato spindle tuber. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2009-0804-0. Режим доступу до журн.: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/pages/potatospindletuber.aspx>.
9. Xiong Z., Department of Plant Pathology, University of Arizona, Forbes 204, Tucson, AZ 85721 Режим доступу до журн.: <http://ag.arizona.edu/~zxiong/plp611/lect18.html>.

Разработана диагностическая тест-система на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вирида веретеновидности клубней картофеля. Проведено лабораторное испытание созданной ПЦР тест-системы и оптимизированы условия проведения реакции амплификации.

Диагностика, ПЦР, вириод веретеновидности клубней картофеля

Polymerase chain reaction (PCR) diagnostic test systems for the identification of potato spindle tuber viroid has been developed. Laboratory research of created PCR diagnostic system has been carried out and the conditions of amplification reaction realization have been optimized.

Diagnostic system, PCR, potato spindle tuber viroid