

УДК 602:632.3:635.112

ПЛР-ДІАГНОСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ МОЗАЇКИ БУРЯКА

І. М. Андрусик, аспірант*

І. О. Антіпов, кандидат сільськогосподарських наук

Є. М. Богач, аспірант**

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей генів, що кодує білок оболонки вірусу. Показано консервативні ділянки нуклеотидних послідовностей вірусу мозаїки цукрового буряка. На основі проведеного аналізу створено дизайн праймерів.

Вступ. Значна кількість вірусних захворювань на посівах цукрового буряка проявляються різноманітними симптомами і відрізняються як за складом збудників, так і за їх шкідливістю [5]. Рослини цукрових буряків уражуються різного роду вірусами, серед яких найпоширенішими є віруси некротичного пожовтіння жилок буряка, жовтяниці буряка, слабого пожовтіння буряка та мозаїки буряка [4, 6].

При розвитку мозаїки цукристість зменшується на 0,4–1% і одночасно знижується врожайність насіння (на 15–20%) та коренеплодів [1].

Загальну характеристику вірусу мозаїки цукрових буряків (*Beet mosaic virus* (BtMV)) і застосування молекулярно-біологічних методів його діагностики наведено в працях [1–3, 5, 9–15].

BtMV відноситься до групи *Potyvirus*, має ниткоподібну форму віріонів розміром 695–770 нм. В уражених клітинах утворює паракристалічні включення, помітні у світловому мікроскопі. Генوم BtMV містить 9591 нуклеотидів та одну відкриту рамку читування [1, 4].

За умов ураження цукрових буряків BtMV симптоми захворювання маскуються за температури вище 21 °C і нижче 10 °C. У світло-зелених ділянках листків міститься до 70–80% інфікованих вірусом клітин, у темно-зелених – тільки 2–7%. Темно-зелені ділянки мозаїчного листка мають певний рівень стійкості проти вірусу. За різких форм виявлення хвороби листки деформуються і згортаються, здебільшого у середину [1].

Матеріали та методи досліджень. Матеріалом для досліджень слугували листкові пластинки рослин цукрових буряків сортів Кармеліта, Альона, Настя, Джорджина, Лавінія і Леопард із симптомами захворювання BtMV, які відбирались в агроценозах Агрономічної дослідної станції НУБіП України. Дослідження проводили в лабораторії кафедри екобіотехнології та біорізноманіття НУБіП України. Екстракцію РНК проводили за допомогою комерційного набору «РИБО-сорб» (AmpliSens, РФ), а зворотну транскрипцію, – застосовуючи комплект реагентів Реверта-Л, (AmpliSens, РФ) згідно рекомендацій виробника. Полімеразну ланцюгову

*Науковий керівник – доцент І.О. Антіпов.

**Науковий керівник – член-кореспондент НАН України І.П. Григорюк.

реакцію проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems). Під час проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували олігонуклеотидні праймери власного дизайну, специфічні до консервативних ділянок геномів BtMV. Режим ампліфікації: 5 хв при 95°C – денатурація кДНК; наступні 30 циклів 30 с за температури 95°C – денатурація; 30 с за температури 55°C – відпал праймерів; 30 с за температури 72°C – синтез комплементарних ланцюгів ДНК.

Після закінчення ПЛР проводили електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації в 1,5% агарозному гелі з додаванням бромового етидію в концентрації 0,5 мкг/мл [8].

На електрофореграмі відзначали наявність (або відсутність) яскраво-червоних ампліконів певного розміру. Специфічність ампліфікованого фрагменту ДНК визначали за його розміром по відношенню до фрагментів стандартних маркерів. Візуалізацію продуктів ампліфікації проводили в ультрафіолетовому світлі [11].

Результати досліджень. Відбір рослинного матеріалу проводився за зовнішніми симптомами ураження. З метою виявлення вірусного захворювання провели візуальне обстеження посівів цукрових буряків на дослідних полях і відібрали рослини з чітким проявом вірусу BtMV, який виявляється у просвітлінні жилок, мозаїчному малюнку на молодих листках, виникненні дрібних, різних за формою маслянистих плям, а за різних форм ураження – деформації та скручуванні листків (рис. 1). Спостерігається також затримка росту, що призводить до карликовості рослин.

Від чіткого і постійного контролю за фітосанітарним станом посівів цукрових буряків залежить продовольча і біологічна безпека у країні. Одним з основних методів здійснення такого контролю є високо-специфічна і ефективна діагностика та ідентифікація фітопатогенів. Отже, вини-

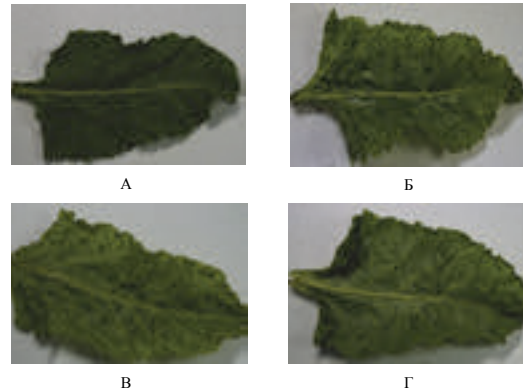


Рис. 1. Симптоми вірусу мозаїки буряка на листових пластинах гібридів цукрових буряків: (А – Настя, Б – Альона, В – Кармеліта, Г – Джорджина)

кає необхідність застосування молекулярно-біологічних методів діагностики, таких як ПЛР, за допомогою якого можна виявити конкретну нуклеотидну послідовність геному в листках цукрових буряків.

У процесі дослідження нами проведено боінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей генів, що кодує білок оболонки вірусу. Виявлено консервативні ділянки нуклеотидних послідовностей вірусу мозаїки буряка. На підставі проведеного аналізу створено дизайн праймерів:

BtMV-1 5'-ggccatacatgcctcggtat-3'

BtMV-2 3'-gtgagcgttgacatctgtgg-5'

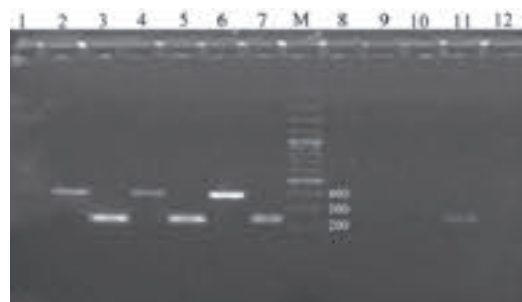


Рис. 2. Електрофореграма продуктів визначення BtMV (трек 1, 3, 5, 7, 9, 11): 1-12 – аналізовані зразки гібридів цукрових буряків (1, 2 – Леопард; 3, 4 – Настя; 5, 6 – Альона; 7, 8 – Кармеліта; 9, 10 – Лавінія; 11, 12 – Джорджина); (М) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)



За допомогою методу ПЛР проаналізовано зразки уражених ВtMV листків цукрових буряків зазначених вище сортів (рис. 2).

На електрофореграмі чітко видно, що у сортів Настя, Альона, Кармеліта і Джорджина розмір продукту ампліфікації становить 239 п.н., а це свідчить про наяв-

ність ВtMV. Отже, розроблена діагностична тест-система є ефективною.

Висновок

Застосування розроблених методом полімеразної ланцюгової реакції праймерів для ідентифікації РНК вірусу мозаїки цукрових буряків забезпечує синтез фрагментів ДНК розрахованого розміру.

Література

1. Власов Ю. И. Ларина Э. И. Сельскохозяйственная вірусологія. – М.: «Колос», 1982. – 237 с.
2. Дьяконов А.В. Вирусные болезни сахарной свеклы // Защита растений. – 1994, №8. – С. 38.
3. Лялько И.М. Изучение вирусных болезней сахарной свеклы в процес се селекции на повышение устойчивости к заболеваниям: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05 / Всерос. НИИ сах. свеклы и сахара им. А. Л. Мазлумова. – Рамонь, 2001. – 23 с.
4. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія». – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – С. 129–133.
5. Постоев О. М. Характеристика вірусів, що уражують цукрові буряки // Вісник КНУ. – 2011. – №14. – С. 53–57.
6. Роїк М.В., Нурмухаммедов А., Корнієнко А. Хвороби коренеплодів цукрових буряків: Монографія. – К.: Поліграфколсантінг, 2004. – 224 с.
7. Шпаар Д. Сахарная свекла. Выращивание, уборка и хранение. – М.: DLV АГРОДЕЛО, 2006. – 207 с.
8. Bennett C. Sugar beet yellows disease in the United States U.S. Dept. Of Agriculture / Bennett C. – 1960. – 63 p.
9. Dusi A. Beet mosaic virus: epidemiology and damage // PhD thesis Wageningen Netherlands 137. – 1999. – 47 p.
10. Lewellen R. Inheritance of Beet mosaic virus resistance in sugar beet // Phytopathology. – 1973. – 63. – P. 877–881.
11. Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach // J. Clin. Laborat. Analysis. – 2002. – 16. – P. 47–51.
12. The complete nucleotide sequence, genome organization, and specific detection of Beet mosaic virus / L. Nemchinov, J. Hammond, R. Jordan, R. Hammond // Arch Virol. – 2004. – 149. – P. 1201–1214.
13. Characterization of an isolate of Beet mosaic virus from South Kazakhstan / Rogov V., Karasev A. Agranovsky A., Gorbunova N. // Plant Pathology. – 1991. – 40, №4. – P. 515–523.
14. Shepherd R., Hills F., Hall D. Losses caused by beet mosaic virus in California-grown sugar beets // Soc. Sugar Beet Tech. – 1964. – 13. – P. 244–251.
15. Wintermantel W. Co-infection of Beet mosaic virus with Beet yellowing viruses leads to increased symptom expression on sugar beet / PlantDisease. – 2005. – 89, №3. – P. 325–33.

АННОТАЦІЯ

Андрусик І.М., Антіпов І.А., Богач Є.М.
ПЦР-діагностика та ідентифікація вірусу мозаїки свекли // Біоресурси і природокористування. – 2014. – 6, №5–6. – С.11–13.

Проведен біоінформаційний аналіз нуклеотидних послідовностей гена, який кодує білок оболонки вірусу. Показані консервативні участки нуклеотидних послідовностей вірусу мозаїки сахарної свекли. На основі проведеного аналізу створен дизайн праймерів.

SUMMARY

I. Andrusyk, I. Antipov, E. Bogach.
PCR-diagnostics and identification of beet mosaic virus // Biological Resources and Nature Managment. – 2014. – 6, №5–6. – P.11–13.

Bioinformatics analysis of the nucleotide sequences of gene that encodes the coat protein of a virus is done. Nucleotide sequences of the conserved regions of sugar beet mosaic virus are shown. Based on the analysis the design primers are created.