

УДК 577.21:57.083.1:635.21

<sup>1</sup>**І.О. АНТШОВ**, кандидат сільськогосподарських наук,

<sup>1</sup>**К.В. ГРИНЧУК**, аспірант,

<sup>2</sup>**М.В. ЄРМОЛАЄВ**, провідний фахівець сектору вірусології,

<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування України

<sup>2</sup>Державна установа «Центральна фітосанітарна лабораторія».

## РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ (BNYVV)

*Розроблено діагностичні тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку. Проведено лабораторне випробовування створених ПЛР діагностикумів та оптимізовані умови проведення реакції ампліфікації. Здійснено ІФА скринінг BNYVV в агроценозах України.*

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

**Вступ.** Ризоманія – одна з найнебезпечніших хвороб цукрових буряків вірусної природи. При інфікуванні рослин цукрових буряків втрати врожаю можуть досягати 50%, а за деякими даними 80%, при цьому цукристість коренеплодів знижується з 16-18 % до 10%.

Перші повідомлення про появу ризоманії з'явилися в Італії в 1952 році. Через десять років хвороба цілком охопила північну й східну частину Центральної Італії. Причиною хвороби було встановлено вірус некротичного пожовтіння жилок буряку (Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)) роду *Benyvirus* [3, 6]. Передача вірусу, відбувається за допомогою мікроскопічного гриба *Polymyxa betae* з родини Плазмодіофорових. Після реплікації вірус потрапляє через мембрану у гриб і накопичується у цистосорусі. І таким чином може зберігатися в ґрунті протягом багатьох років [7]. Геном BNYVV чотирьох або п'ятипартидний, представлений лінійною одноланцюговою (+)РНК розміром 6,7, 4,6, 1,8, 1,4 and 1,3 тис. н. Віріони паличкоподібні, зазвичай прямої форми довжиною 85, 100, 265 та 390 нм та 20 нм шириною [5]. Вірус має три основні патотипи А, В і Р.

Унікальна природа патогенного вірусу, складний життєвий цикл векторів грибної природи і широке поширення основних патотипів вірусу та різних штамів призвели до ускладнення контролю розповсюдження BNYVV.

Контроль ризоманії залежить від наявності точних і чутливих методів виявлення BNYVV в рослинах та ґрунті. Такі методи необхідні для виявлення інфікованих полів та пошуку стійких до вірусу рослин в селекційно-генетичній роботі [2]. Поліпшення стійкості буряків до BNYVV на генетичному рівні є одним з пріоритетних напрямків боротьби з ризоманією. Одним з таких чутливих методів є метод імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням поліклональних та моноклональних антитіл [1]. Метод ІФА досить надійний та швидкий. Результати реакції можна отримати протягом 6 - 24 год. [9]. Рядом авторів показано ефективність застосування ІФА для діагностики та ідентифікації BNYVV [4, 8]. Але разом з тим відмічено невисоку ефективність серологічних методів при низьких титрах вірусів.

Інші підходи застосовуються при використанні молекулярно-біологічних методів діагностики вірусів, які базуються на ідентифікації специфічних послідовностей вірусних геномів. Ці методи дозволяють у досить швидкий термін з високою чутливістю та точністю проводити діагностику вірусних захворювань [10].

Таким чином збиток, нанесений вірусами, може бути значно знижений за умови проведення щорічного моніторингу вірусних захворювань і їх переносників з метою прогнозу можливої появи епіфітотій та розробки науково та економічно обґрунтованих рекомендацій щодо заходів боротьби. Для своєчасного виявлення вірусних захворювань та проведення захисних заходів необхідно використовувати високочутливу, суворо специфічну експрес діагностику.

*Мета дослідження.* Розробка біотехнологічних прийомів молекулярно-біологічної діагностики та ідентифікації контролю вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку методом ПЛР.

**Методика і матеріал досліджень.** Матеріалом для дослідження були коренеплоди цукрового буряку, відібрані в різних кліматичних зонах України.

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

Екстракцію сумарної РНК проводили за стандартною методикою [7]. На останньому етапі сумарну РНК розчиняли в 50 мкл DEPC. Зразки РНК зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» згідно рекомендацій виробника.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems) у реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка містила 1х ПЛР буфер з 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTPs) (Ампли Сенс), 0,5 мкМ специфічних олігонуклеотидних праймерів, 10-50 нг матричної ДНК, 0,5 U Taq полімерази (Ампли Сенс). ПЛР проводили за наступних умов: початкова денатурація 5 хв.  $94^{\circ}\text{C}$ ; тридцять п'ять циклів: денатурація 30 с.  $94^{\circ}\text{C}$ ; відпал праймерів 30 с.  $60^{\circ}\text{C}$ ; елонгація 30 с.  $72^{\circ}\text{C}$ .

Після проведення ПЛР продукти реакції розділяли електрофорезом у 1,5%-му агарозному гелі. По завершенні електрофорезу гель забарвлювали 1% розчином бромового етидію, візуалізували за допомогою UV транс ілюмінатора.

**Результати досліджень.** Нами проведено скринінг посівів цукрових буряків в різних регіонах України на предмет ураження вірусом некротичного пожовтіння жилок буряку. Відібрано зразки коренеплодів з різних районів Чернівецької, Черкаської, Чернігівської, Хмельницької, Тернопільської, Вінницької, Житомирської, Рівненської, Київської областей. Методом ІФА встановлено наявність BNYVV в зразках коренеплодів цукрового буряку, відібраних в Чемеровецькому районі Хмельницької області (табл.1).

Таблиця 1

**Результати ІФА скринінгу BNYVV в агроценозах України**

Місце відбору проб	Показники оптичної щільності за довжини хвилі 405 нм	Ураженість BNYVV
1	2	3
<b>Чернівецька область</b>		
Заставнівський район	0,159	-
<b>Черкаська область</b>		
Маньківський район	0,181	-
Корсунь-Шевченківський район	0,169	-
Золотоніський район	0,155	-
Уманський район	0,131	-
<b>Чернігівська область</b>		
Бобровицький район	0,223	-
Прилуцький район	0,122	-
Ічнянський район	0,106	-
Носівський район	0,163	-
<b>Хмельницька область</b>		
Красилівський район	0,125	-
Чемеровецький район	3,052	+
Старокостянтинівський район	0,117	-
Старосинявський район	0,172	-
<b>Тернопільська область</b>		
Гусятинський район	0,120	-
Заліщицький район	0,281	-
Требовлянський район	0,196	-
Бучацький район	0,183	-
Чортківський район	0,180	-

1	2	3
<b>Вінницька область</b>		
Барський район	0,159	-
Тростянецький район	0,296	-
Томашпільський район	0,191	-
Хмільницький район	0,144	-
<b>Житомирська область</b>		
Попільнянський район	0,133	-
Андрушівський район	0,103	-
Бердичівський район	0,186	-
Житомирський район	0,105	-
<b>Рівненська область</b>		
Острозький район	0,119	-
Рівненський район	0,139	-
Гощанський район	0,140	-
Радивилівський район	0,354	-
Дубенський район	0,137	-
<b>Київська область</b>		
Васильківський район	0,124	-
Згурівський район	0,156	-
Баришівський район	0,154	-
Яготинський район	0,130	-
Негативний контроль	0,113	
Позитивний контроль	2,276	

Для дизайну праймерів, специфічних до нуклеотидних послідовностей BNYVV, нами проведено біоінформативний аналіз, який включав скринінг послідовностей генів вірусу, що кодує білок оболонки за допомогою генетичного банку даних (GenBank). На підставі узагальнених даних щодо відомих нуклеотидних послідовностей вірусних геномів виявлено специфічні консервативні нуклеотидні послідовності, які можуть бути використані як матриці для олігонуклеотидних праймерів у процесі синтезу вірусспецифічних фрагментів нуклеїнових кислот. Аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення «MultAlin» (Multiple sequence alignment). В якості матриці використовували ген, що кодує білок оболонки BNYVV (PHK-2).

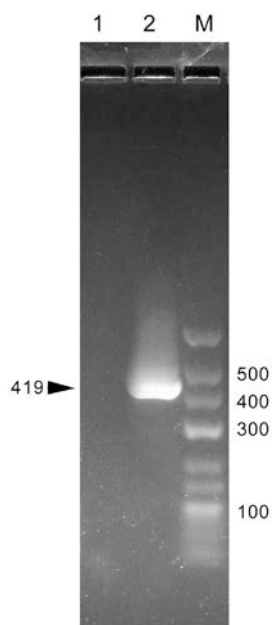


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР аналізу визначення BNYVV в зразках цукрових буряків. 1 – негативний контроль, 2 – зразок, М – маркер молекулярної ваги (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM1203).

Використовуючи консенсусну нуклеотидну послідовність гену, що кодує білок оболонки BNYVV, за допомогою програмного забезпечення «Primer3» нами створено дизайн праймерів з оптимальними параметрами: BNYVV1 5'-ttcgagcgtcgtgagtgtta-3', BNYVV2 5'-cccgagtcacattaattcc-3' з утворенням продукту ампліфікації розміром 419 п.н.

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. рис.1.

Таким чином підтверджено працездатність розробленої тест системи.

Оптимізовано параметри температурного режиму при проведенні ПЛР діагностики BNYVV. Встановлено оптимальні температури відпалу, які знаходяться в межах 58-60<sup>0</sup>С.

**Висновки.** Створено діагностичні тест-системи для діагностики та ідентифікації вірусу некротичного пожелтіння жилок цукрового буряку на основі методу ПЛР. Проведено лабораторне випробовування створених діагностичних тест-систем та оптимізовані умови проведення реакції ампліфікації, що відкриває можливості для широкого впровадження ПЛР діагностикумів у лабораторну практику при проведенні фітосанітарного та карантинного контролю в процесі вирощування цукрових буряків.

**Список використаних літературних джерел.**

1. Clark M.F. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. / M.F. Clark, A.N. Adam, J. Gen. Virol., 1977 – № 34: 474–83.
2. Henry C.M. Occurrence of a soilborn virus of sugar beet in England / C.M Henry, R.A.C. Jones, R.H.A. Coutts Plant Pathol., 1986. – 35: P. 585–91.
3. Koenig R. Beet necrotic yellow vein virus. CMI / R. Koenig, T. Tamada AAB Descriptions of Plant viruses, 2000. – No. 144.
4. Koenig R. Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in a sugarbeet growing regions area in Europe. / R. Koenig, A.M. Haeberle and U. Com-mandeur, Arch. Virol., 1998. – 142: P. 499–504
5. Putz C. Composition and structure of beet necrotic yellow vein virus / J.Gen.Virol, 1977. – 35. – P.397 – 401.
6. Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania affected sugar beet in Japan. Ann. Appl. Biol. / T.Tamada, T. Baba, 1973. – 113, P. 519–30.
7. Tamada T. Beet necrotic yellow vein virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses, 1975. – No. 144.
8. Torrance L. Production and some characteristics of monoclonal antibodies against beet necrotic yellow vein virus. / L. Torrance, M. Pead and G. Buxton Ann. Appl. Biol., 1988. – 113: P. 519–30.
9. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 300 с.
10. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с.

**Аннотация**

**Антипов И.А., Гринчук К.В., Ермолаев М.В.**

**Разработка ПЦР тест-систем для диагностики и идентификации вируса некротического пожелтения жилок свеклы (BNYVV)**

*Разработаны диагностические тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления вируса некротического пожелтения жилок свеклы. Проведено лабораторное испытание созданных ПЦР диагностикумов и оптимизированы условия проведения реакции амплификации. Проведено ИФА скрининг BNYVV в агроценозах Украины.*

**Ключевые слова:** диагностика, ПЦР, вирус некротического пожелтения жилок свеклы.

**Annotation**

**Antipov I., Grynchuk K, Ermolaev M.**

**Development of PCR test systems for the diagnosis and identification beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)**

*Polymerase chain reaction (PCR) diagnostic test systems for the identification of beet necrotic yellow vein virus have been developed. Laboratory research of created PCR diagnosticum has been carried out and the conditions of amplification reaction realization have been optimized An ELISA screening BNYVV in agroecosystems Ukraine has been carried.*

**Key words:** diagnosis, PCR, beet necrotic yellow vein virus.