

УДК 633.63:632.651

ПИЛИПЕНКО Л.А., кандидат біол. наук, п.н.с.,

Інститут захисту рослин НААН

КАЛАТУР К.А., кандидат с.-г. наук, п.н.с.,

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

e-mail: pylypenkol@mail.ru

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ БУРЯКОВОЇ НЕМАТОДИ *HETERODERA SCHACHTII* SCHMIDT

У статті детально подано методи молекулярно-генетичної діагностики бурякової цистоутворюючої нематоди *Heterodera schachtii* Schmidt: полімеразно – ланцюгова реакція (ПЛР) з універсальними для роду *Heterodera* праймерами та подальшим вивченням поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів; ПЛР із видоспецифічними ITS rDNA праймерами; ПЛР в режимі реального часу з SYBR green I барвником.

Ключові слова: бурякова цистоутворююча нематода, полімеразно – ланцюгова реакція, праймери

Вступ. Одними з найбільш небезпечних патогенів, що уражують кореневу систему рослин, є різні види седентарних ендопаразитичних нематод, які належать до родини *Heteroderidae*, здатних паразитувати на багатьох сільськогосподарських культурах, викликаючи їх захворювання та подальшу втрату врожаю. Серед них особливо шкідливими вважаються декілька видів: злакова (*Punctodera punctata*), картопляні золотиста (*Globodera rostochiensis*) та бліда (*G. pallida*), вівсяна (*Heterodera avenae*), соєва (*H. glycines*), хмельова (*H. humuli*), конюшинна (*H. trifolii*), люцернова (*H. medicaginis*), горохова (*H. goettingiana*) і бурякова (*H. schachtii*) нематоди [1]. Як показала практика, розрізнити ці види можна лише на підставі морфологічних та морфометричних досліджень нематод різного віку і статі, спостережень за кольором самиць у період перетворення їх на цисти та запровадження системи біотестів. Однак, проведення ідентифікації цистоутворюючих нематод за вищенаведеною схемою потребує залучення до роботи нематологів-таксономістів високої кваліфікації, займає багато часу та вирізняється значною трудомісткістю. Тому впродовж останніх 15 років при проведенні фітогельмінтологічного аналізу цих видів фітонематод все більшого застосування набувають методи молекулярно-генетичної діагностики, в основі яких лежить оцінка нуклеотидної послідовності (сіквенсу) специфічного фрагмента їх генетичного матеріалу (ДНК, кДНК або РНК) [2]. Так, за останні 15 років зусиллями багатьох науковців були розроблені декілька протоколів молекулярно-генетичної діагностики для такого виду як бурякова нематода *H. schachtii*, яка є збудником гетеродерозу – широко поширеного і шкідливого захворювання цукрових буряків в багатьох країнах світу.

Саме тому метою нашої роботи було узагальнення наявних на даний час методів молекулярно-генетичної діагностики бурякової цистоутворюючої нематоди.

Результати досліджень. Серед методів молекулярно-генетичної діагностики бурякової нематоди найбільшого впровадження у практику діагностичних лабораторій світу набув метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), який має високу чутливість, специфічність і дозволяє виконувати аналіз протягом 4-8 годин.

Основними з цих методів є: полімеразно – ланцюгова реакція з універсальними для роду *Heterodera* праймерами та подальшим вивченням поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів [3]; полімеразно – ланцюгова реакція із видоспецифічними ITS rDNA праймерами [4]; полімеразно – ланцюгова реакція в режимі реального часу з SYBR green I барвником [5].

Полімеразно-ланцюгова реакція з використанням поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів [3].

Полімеразно-ланцюгову реакцію використовують по відношенню до нематод, які за морфологічними ознаками були ідентифіковані як *Heterodera sp.* оскільки праймери не є

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

видоспецифічними; подальший рестрикційний аналіз дозволяє діагностувати *H. schachtii* з понад 20 інших видів нематод роду *Heterodera*.

ДНК екстрагують від 1-4 цист попередньо виділених з ґрунтових / рослинних зразків. Для цього цисти переносять в пробірки типу Еппендорф, що містять 10 мкл двічі стерилізованої води, та гомогенізують за допомогою мікрогомогенізатора. До розчину додають 8 мкл лізуючого буферу, що складається з наступних компонентів:

KCl	125 мМ
Tris HCl, pH = 8.3	25 мМ
MgCl ₂	3,75 мМ
DTT	2,5 мМ
Tween 20	1,125 %
Желатин	0,025 %

Далі додають 2 мкл протейнази К (600 мкг/мкл), перемішують та інкубують за температури 65°C впродовж 60 хв., після чого при 95°C – впродовж 10 хв. Додаткове очищення ДНК не потрібне. До подальшого використання аліквоти ДНК зберігають за температури -20°C чи -80°C (більш тривалий термін зберігання).

Полімеразно – ланцюгову реакцію проводять з використанням олігонуклеотидів, комплементарних ITS ділянці геному рибосомального кластера рДНК (рис. 1).

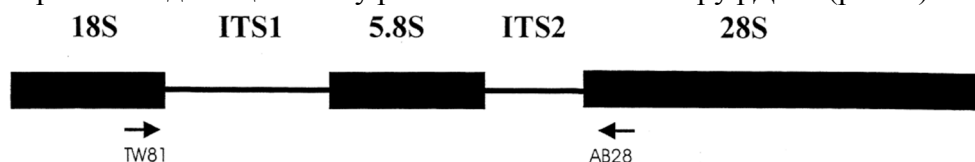


Рис. 1. Схема організації ДНК рибосомального кластера з позиціями праймерів для полімеразно-ланцюгової реакції TW81 та AB28

TW81 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' [6]
AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3' [6]

Протокол реакції:

Master mix	Концентрація в 100 мкл реакційної суміші
10 X PCR Buffer що містить 15 мМ MgCl ₂ , (Qiagen)	10 мкл (кінцева концентрація 1X: 1.5 мМ MgCl ₂)
5 X Q-solution (Qiagen)	20 мкл
dNTPs (Qiagen)	200 мкМ
Праймер AB28	1,5 мкМ
Праймер TW81	1,5 мкМ
Taq DNA Polymerase, 5 од. / мкл (Qiagen)	0,8 одиниці
ДНК	10 мкл
ddH ₂ O	

Температурний режим реакції:

94°C	4 хв.	35 циклів
94°C	1 хв.	
55°C	1,5 хв.	
72°C	2 хв.	
72°C	10 хв.	

Електрофоретичне розділення отриманих продуктів ампліфікації (об'ємом 5,0 мкл; решту матеріалу залишають для подальшого рестрикційного аналізу) проводять в 1% агарозному гелі з наступною візуалізацією в ультрафіолетовому світлі за стандартною процедурою [7]. Для визначення молекулярної маси отриманих продуктів ампліфікації

використовують маркер молекулярного розміру. Результат реакції оцінюється як позитивний, якщо виявляють амплікони довжиною – 1060 п.н.

Для рестрикційного аналізу отримані амплікони обробляють ензимом *MvaI* (Gibco Co., BRL) за протоколом виробника.

Електрофоретичне розділення отриманих продуктів рестрикції проводять у 1,5% агарозному гелі з наступною візуалізацією в ультрафіолетовому світлі за стандартною процедурою [7]. Для визначення молекулярної маси отриманих продуктів рестрикції використовують маркер молекулярного розміру 100 п.н. Профілі рестрикційних фрагментів характерних для видів роду *Heterodera* наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Орієнтовні профілі рестрикційних фрагментів цистоутворюючих нематод роду *Heterodera* за використання *MvaI* [3, 8]

Види нематод роду <i>Heterodera</i>	Розмір фрагментів амплікону ПЛР реакції (п.н.)
<i>H. schachtii</i>	1010, 840, 760, 630, 220, 150, 80
<i>H. avenae</i> (type A)	400, 330, 290
<i>H. avenae</i> (type B)	400, 330, 290
<i>H. arenaria</i>	400, 330, 290
<i>H. filipjevi</i>	400, 330, 290
<i>H. aucklandica</i>	400, 330, 290
<i>H. iri</i>	420, 330, 290
<i>H. latipons</i>	420, 330, 290
<i>H. hordecalis</i>	440, 330, 290
<i>H. trifolii</i>	760, 220, 80
<i>H. medicaginis</i>	760, 220, 80
<i>H. ciceri</i>	760, 220, 80
<i>H. salixoplila</i>	400, 330, 290
<i>H. oryzicola</i>	470, 300, 210
<i>H. glycines</i>	760, 220, 80
<i>H. cajani</i>	760, 300
<i>H. humuli</i>	760, 300
<i>H. ripae</i>	760, 300
<i>H. fici</i>	690, 200, 80
<i>H. litoralis</i>	560, 310, 290, 240
<i>H. carotae</i>	760, 300
<i>H. cruciferae</i>	760, 300
<i>Heterodera</i> sp.	800, 260
<i>H. cyperi</i>	780, 320
<i>H. goettingiana</i>	760, 300
<i>H. urticae</i>	760, 300

Полімеразно-ланцюгова реакція із видоспецифічними праймерами [4]

ДНК екстрагують від декількох цист, однієї цисти чи навіть личинки, попередньо виділених з ґрунтових / рослинних зразків.

Для цього нематод переносять в пробірки типу Еппендорф, що містять 8 мкл двічі стерилізованої води, та гомогенізують за допомогою мікрогомогенізатора. До розчину додають 10 мкл лізуючого буферу, який складається з наступних компонентів:

KCl	500 мМ
Tris HCl, pH = 8.0	100 мМ
MgCl ₂	15 мМ
DTT	1,0 мМ
Tween 20	4,5 %

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Далі додають 2 мкл протеїнази К (600 мкг/мл), перемішують та інкубують за температури 65°C впродовж 1 години, після чого при 95°C – впродовж 10 хв. До подальшого використання аліквоти ДНК зберігають за температури –20°C чи –80°C (більш тривалий термін зберігання).

Полімеразно – ланцюгову реакцію проводять з використанням олігонуклеотидів, комплементарних ITS ділянці геному рибосомального кластера рДНК *Heterodera spp.* [4] (рис. 2).

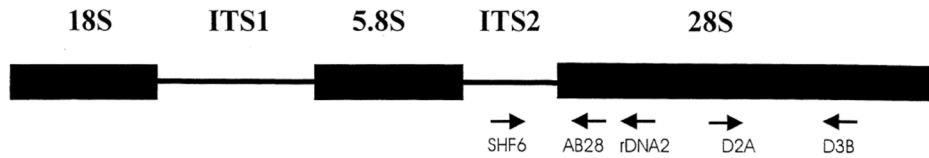


Рис. 2. Схема організації ДНК рибосомального кластера з позиціями праймерів для полімеразно-ланцюгової реакції SHF6, AB28, rDNA2, D2A та D3B

SHF6	5'-GTTCTTACGTTACTTCCA-3'	[4]
AB28	5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'	[6]
rDNA2	5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'	[9]
D2A	5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3'	[10]
D3B	5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3'	[10]

Протокол реакції:

<i>Master mix</i>	<i>Концентрація в 100 мкл реакційної суміші</i>
10 X Qiagen PCR buffer	2,5 мкл
5 X Q-solution (Qiagen)	5 мкл
10 mM dNTPs (Qiagen)	0,5 мкл
Праймер 1	1,5 мкМ
Праймер 2	1,5 мкМ
Taq DNA Polymerase, 5 од. / мкл (Qiagen)	1,5 одиниці
ДНК	2 мкл
ddH ₂ O	12 мкл

На кожен зразок ДНК закладають 2 реакції:

- 1) за використання видоспецифічного праймеру SHF6 в парі з праймером AB28 чи rDNA2 – для одержання специфічного амплікону;
- 2) з універсальними праймерами D2A та D3B – для внутрішнього контролю реакції.

Температурний режим реакції:

94°C	4 хв.	10 циклів
94°C	30 с.	
45°C	40 с.	
72°C	1 хв.	20 циклів
94°C	30 с.	
55°C	40 с.	
72°C	1 хв.	
72°C	10 хв.	

Електрофоретичне розділення одержаних продуктів рестрикції проводять в 1% агарозному гелі з наступною візуалізацією в ультрафіолетовому світлі за стандартною процедурою [7]. Для визначення молекулярної маси одержаних продуктів ампліфікації використовують маркер молекулярного розміру.

Результат реакції оцінюється як позитивний (наявність *H. schachtii* у зразку), якщо виявляють амплікон довжиною 200 п.н. (для пари праймерів SHF6 та AB28) або 255 п.н. (для пари праймерів SHF6 та rDNA2).

Високу якість екстрагованої ДНК нематод визначають за наявністю амплікону довжиною 800 п.н. за використання в реакції пари універсальних праймерів D2A та D3B.

ПЛР в режимі реального часу з SYBR green I барвником [5]

ДНК екстрагують від декількох цист або личинок (щонайменш - п'ятьох), попередньо виділених з ґрунтових / рослинних зразків. Для цього нематод переносять в пробірки типу Еппендорф, що містять 20 мкл двічі стерилізованої води, та гомогенізують за допомогою мікрогомогенізатора. До гомогенату додають 12 мкл протеїнази К (600 мкг/мл) та стандартизований буферний розчин для здійснення ПЛР – 1 X PCR (Qiagen, Germany) таким чином, щоб кінцевий об'єм суміші становив 132 мкл. Матеріал інкубують за температури 65°C впродовж 1 години, після чого при 95°C – впродовж 15 хв. До подальшого використання аліквоти ДНК зберігають за температури -20°C чи -80°C (більш тривалий термін зберігання).

Полімеразно – ланцюгову реакцію в реальному часі проводять з використанням олігонуклеотидів, комплементарних ITS ділянці геному рибосомального кластера рДНК - SH6Mod 5'-CGTGTCTTACGTTACTTCCA-3' (модифіковано за Amiri et al., 2002) [4] та SH4 5'-AGCATGCGAAGGATTGG-3'.

Реакційну суміш загальним об'ємом 25 мкл готують за використання 12 мкл 1 X SYBR Green I PCR Master Mix (Applied Biosystems) з додаванням 0,1 мкМ кожного праймеру та 4 мкл ДНК.

Температурний режим реакції:

50°C	2 хв.	30 циклів
95°C	10 хв.	
95°C	15 с.	
65°C	1 хв.	

По закінченню реакції здійснюють аналіз температури плавлення одержаного амплікону: на присутність *H. schachtii* в пробі буде вказувати крива плавлення з піком при температурі 84.6°C+0.1.

Висновки. ПЛР є ефективним інструментом для точної, надійної та швидкої ідентифікації бурякової нематоли з-поміж 40 (з 60) видів роду *Heterodera*. ПЛР у реальному часі являє собою навіть ще більш прискореним методом діагностики, тому що усуває трудомісткий етап аналізу продуктів ампліфікації в агарозному гелі по закінченню реакції. Методи молекулярної діагностики ідентифікації високо чутливі: позитивний результат може бути одержаний навіть якщо одна інвазійна личинка або циста змішана з іншими видами нематод. Точна ідентифікація нематод допомагає розробці ефективних методів їх контролю.

Список використаних літературних джерел

1. Кирьянова Е.С. Паразитические нематоды растений и меры борьбы с ними / Е.С. Кирьянова, Э.Л. Кралль. – Л.: Наука, 1971. – Т. 1. – 443 с.
2. Waeyenberge L. Molecular identification of *Heterodera spp.*, an overview of fifteen years of research / L. Waeyenberge, N. Viaene, S.A. Subbotin, M. Moens // Cereal cyst nematodes: status, research and outlook / I.T. Riley, J.M. Nicol, A.A. Dababat (eds.). – CIMMYT: Ankara, Turkey, 2009. – P. 109-114.
3. Subbotin S.A. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (*Nematoda: Heteroderidae*) based on the ribosomal DNA-RFLP / S.A. Subbotin, I. Waeyenberge, M. Moens // Nematology. – 2000. – Vol. 2 (2). – P. 153-164.
4. Amiri S. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR / S. Amiri, S.A. Subbotin, M. Moens // European Journal of Plant Pathology. – 2002. – № 108. – P. 497-506.
5. Madani M. Quantitative detection of the potato cyst nematode, *Globodera pallida*, and the beet cyst nematode, *Heterodera schachtii*, using Real-Time PCR with SYBR green I dye / M. Madani, S.A. Subbotin, M. Moens // Molecular and Cellular Probes. – 2005. – № 19. – P. 81-86.
6. Joyce S.A. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to identification of entomopathogenic nematodes / S.A. Joyce, A.D. Reid, R.F. Rive, J. Curran // Genetics of

entomopathogenic nematode-bacterium complexes / Burnell A. M., Ehlers R.-U., Masson, J. P. (eds). – COST 812 Biotechnology: Proceedings of Symposium & Workshop, St. Patrick's College, Maynooth, Co. Kildare, Ireland, Luxembourg, European Commission, DG XII, 1994. – P. 178-187.

7. Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001. – 1590 p.

8. Amiri S. Comparative morphometrics and RAPD studies of *Heterodera schachtii* and *H. betae* populations / S. Amiri, S.A. Subbotin, M. Moens // Russian Journal of Nematology. – 2003. – № 11. – P. 91-99.

9. Vrain T.C. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group / T.C. Vrain, D.A. Wakarchuk, A.C. Levesque, R.I. Hamilton // Fundamental and Applied Nematology. – 1992. – № 15. – P. 563-573.

10. De Ley P. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirrorimage anatomy (*Nematoda: Cephalobidae*) / P. De Ley, M.A. Felix, L.M. Frisse, S.A. Nadler, P.W. Sternberg, W.K. Thomas // Nematology. – 1999. – № 2. – P. 591-612.

Аннотация

Пилипенко Л.А., Калатур Е.А.

Методы молекулярно-генетической диагностики свекловичной нематоды *Heterodera schachtii* Schmidt

*В статье подробно представлены методы молекулярно-генетической диагностики свекловичной цистообразующей нематоды *Heterodera schachtii*: полимеразно - цепная реакция (ПЦР) с универсальными для рода *Heterodera* праймерами с дальнейшим изучением полиморфизма длины рестрикционных фрагментов; ПЦР с видоспецифичными ITS rDNA праймерами; ПЦР в режиме реального времени с SYBR green I красителем.*

Ключевые слова: свекловичная цистообразующая нематода, полимеразно - цепная реакция, праймеры

Annotation

Pylypenko L., Kalatur K.

Molecular diagnostics of sugar beet nematode *Heterodera schachtii* Schmidt

*The methods of molecular diagnosis of sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* are described including PCR-RFLP with universal primers; PCR with species specific ITS rDNA primers; PCR in real time with SYBR green I dye.*

Keywords: sugar beet cyst nematode, polymerase - chain reaction, primers

Отримано редакцією – 20.05.2014 р.

УДК 633.63.631.1

СІНЧЕНКО В.М., доктор с-г. наук, с.н.с.,

ПИРКІН В.І., кандидат екон. наук, с.н.с.,

МОСКАЛЕНКО В.П., науковий співробітник,

ШАМСУТДІНОВА А.В., АСКАРОВ В.Р., аспіранти

Інститут біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН

УДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДИКИ З ВИЗНАЧЕННЯ ЕКОНОМІЧНОЇ ЕФЕКТИВНОСТІ НАУКОВИХ РОЗРОБОК

Пропонується удосконалена методика визначення економічної ефективності елементів технології, технічних засобів, технологій виробництва сільськогосподарської продукції.

Ключові слова: методика, економічна ефективність, нововведення, річний економічний ефект, технологія, сівозміна, собівартість, прибуток