

УДК 57.065:578.89:631.147

ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ГЕНІВ КАПСИДНИХ БІЛКІВ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСІВ КАРТОПЛІ

І.О. Антіпов, В.Г. Спиридонов, М.Д. Мельничук

Національний аграрний університет,
Вул Героїв оборони 15, Київ, 03041, Україна. E-mail spyrydonov@nauiu.kiev.ua

Phylogenetic analysis of capsid protein genes of ukrainian potato viruses isolates. – I.O. Antipov., V. Spyrydonov, M.D. Melnychuk. – The present work is intended to clone and define partial nucleotide sequences of coat protein genes of Ukrainian isolates of potato viruses group (PVX, PVY, PVM, PVS). We have shown that potato viruses (PVX, PVY, PVM, PVS) isolated from potato plants cultivated in Ukraine occupy an individual branches in phylogenetic structure of viruses spreading. We have created the Real-time PCR diagnostic test-systems, that allow to detect viruses and carry out quantitative analysis of viruses loading in plant tissues.

Address: National agricultural university of Ukraine, 15 Geroiv Oborony Str., Kyiv – 41. 03041 Ukraine, E-mail spyrydonov@nauiu.kiev.ua

Картопля (*Solanum tuberosum* L.) є цінною сільськогосподарською культурою у всьому світі. В Україні вона культивується практично скрізь та особливо в областях поліської та лісостепової зони і переважно вирощується в приватному секторі.

Останнім часом зростає інтерес, щодо збільшення врожайності та переведення цієї культури у промислові масштаби. Однією з передумов високої продуктивності картоплі є використання якісного та вільного від фітопатогенів різної природи посадкового матеріалу, що на сьогодні ставлять за мету основні промислові компанії в Україні, так як і в світі вцілому. Особливу увагу в останні часи привертають патогени саме вірусного походження, оскільки вони виявляються найважче, із-за складностей, які пов'язані з внутрішньоклітинним паразитизмом та нерідко латентною формою ураження.

Найбільш розповсюдженими в світі є X, Y, M та S віруси картоплі, які є збудниками смугастої мозаїки, зморщування, мозаїчного скручування листя, тощо. Ці хвороби є одною з головних причин різкого зниження врожаїв картоплі до 30 відсотків [5].

Метою нашої роботи було визначення нуклеотидної послідовності українських ізолятів вірусів картоплі для розробки вітчизняних

діагностичних тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі. Дані тест-системи вирішують в майбутньому проведення якісного та кількісного аналізу зразків посадкового матеріалу картоплі на предмет наявності латентної вірусної інфекції та визначення вірусного навантаження в посадковому матеріалі з високим ступенем вірогідності.

Матеріали і методика досліджень

Виділення сумарної РНК проводили за допомогою комерційного реагенту «TRIZOL» (Invitrogen), реакцію реверс-транскрипції проводили за допомогою комерційного набору «RevertAid» (Fermentas) згідно із рекомендаціями виробника.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в термоциклері (Applied Biosystems, GeneAmp2400), за таких умов: початкова денатурація ДНК – 94°C – 5хв, послідовні 35 циклів: денатурації 94°C – 30с, відпалу праймерів 55°C – 30с, синтезу 72°C – 30с.

Після проведення ПЛР продукти реакції розділяли електрофорезом у 2% агарозному гелі та забарвлювали 1% розчином бромового етидію,

візуалізували за допомогою UV транслюмінатора і фотографували на цифрову фотокамеру «Olimpus». Продукти реакції ампліфікації виділяли з гелю за допомогою набору “PCR product purification kit” (Qiagen), згідно із рекомендаціями виробника.

Очищені продукти ПЛР, які представляють собою гени білків оболонки вірусів картопляної групи клонували у плазмідний вектор pBluescript II (SK) за оригінальним методом [6].

Трансформацію *E.coli* та виділення плазмідної ДНК проводили за методами [3, 8].

Визначення часткових нуклеотидних послідовностей (сіквенс) генів капсидних білків вірусів картопляної групи проводили на приладі ABI Prism 3130 Genetic Analyzer із використанням набору BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem), згідно із рекомендаціями виробника.

Пошук гомологічних нуклеотидних послідовностей генів капсидних білків вірусів картоплі проводили в базах даних DDBJ/EMBL/GenBank проводили за допомогою програми BLAST [2] та оцінювали за критерієм E (E values) для кожної з пар вірівнених послідовностей. Для більш адекватної оцінки філогенетичних зв'язків було застосовано метод найменших квадратів включений в програму для оцінки філогенії (PHYLP) версія 3,5 [4]. За допомогою отриманих даних були побудовані дендрограми, що відображають філогенетичні зв'язки між відібраними таксономічними одиницями.

Дизайн та синтез праймерів: нуклеотидну послідовність праймерів та флуоресцентних зондів для виявлення вірусів картоплі підбрано із використанням програми Primer Express (Applied Biosystems). Олігонуклеотидні праймери та флуоресцентні зонди синтезували амідітофосфітним методом на автоматичному ДНК синтезаторі ABI 3400 (Applied Biosystems) [7].

Полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (ПЛР-РЧ): кожен зразок досліджували у двох повторях. Ампліфікацію проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, що мала наступний склад: 10x ПЛР буфер, 25 mM MgCl₂, 1,5 mM кожного із дезоксинуклеотидтрифосфатів, 5 пМ праймерів та 2,5 пМ флуоресцентних зондів, 20 мкМ флуоресцентного барвника ROX, 0,2 u. урацил-ДНК-глікозилази, UDG (Fermentas) та 1 u. Таq-полімерази (Fermentas). Досліджувану кДНК вносили у кількості 100-200 нг.

Ампліфікацію ДНК-мішені здійснювали на приладі ABI PRISM SDS 7000 (Applied

Biosystems) із наступним температурним профілем: активація UDG – 5 хв. при 50° С, активація Таq-полімерази – 10 хв. при 94° С, та наступні 40 циклів ампліфікації, які включали денатурацію 15 с при 95° С, відпалу праймерів 1 хв. при 60° С, елонгацію 30 с при 72° С.

Аналіз результатів здійснювали за допомогою програмного забезпечення ABI Prism 7000 Vs. 1.2.3

Основним критерієм щодо оцінки отриманих результатів є значення граничного циклу C_t, яке характеризує певний цикл ПЛР, на якому спостерігається статистично достовірне збільшення флуоресценції у порівнянні із базовим рівнем.

Зразок вважали позитивним при отриманні експоненціальних кривих ампліфікації ДНК-мішені (гену CP) та внутрішнього контролю (ген EF1- α), при значенні менше або дорівнює 38 (C_t ≤ 38). Зразок вважали негативним при відсутності ампліфікації ДНК-мішені та при ампліфікації внутрішнього контролю. У випадку відсутності кривої ампліфікації ДНК-мішені, та значенні C_t кривої ампліфікації внутрішнього контролю більше 38, зразок вважали сумнівним і проводили повторний аналіз. За відсутності кривої ампліфікації внутрішнього контролю проводили повторне виділення РНК із такого зразка.

Результати досліджень та їх обговорення

Першим етапом наших досліджень був пошук вірусів PVX, PVY, PVS, PVM у 15 зразках насінневої картоплі з приватного сектору. Ідентифікацію проводили паралельно двома методами: класичним методом імуноферментного аналізу (ІФА) із використанням комерційного набору «Plantest ELISA» (BioRad), та за допомогою раніше розроблених власних тест систем на основі полімеразної ланцюгової реакції [1].

В результаті проведених досліджень було виявлено присутність вірусів PVX, PVY, PVM, PVS в наступних зразках картоплі (рис. 1).

Визначені часткові нуклеотидні послідовності генів, що кодують білки оболонки українських ізолятів вірусів PVX, PVY, PVM, PVS були проаналізовані за допомогою програми BLAST. На основі отриманих даних були побудовані філогенетичні дерева, що відображають таксономічні зв'язки між існуючими в генетичних базах даних ізолятами вірусів (рис. 2-5).

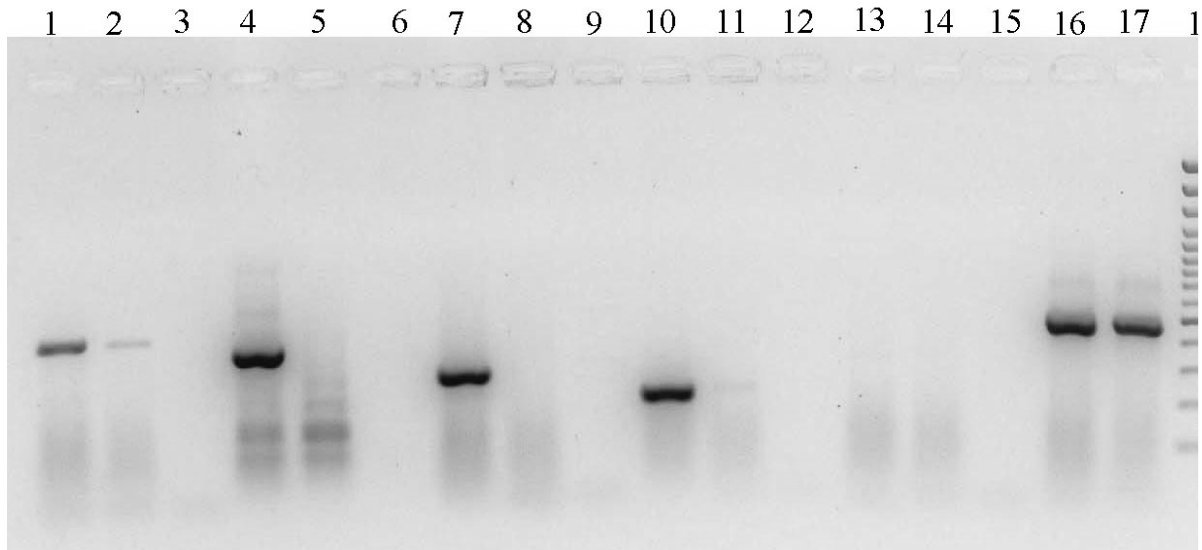


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР вірусів PVX, PVY, PVM, PVS в 15 зразках насінневої картоплі. Зразки: 1, 2 - PVX (411 п.н.); 4 - PVY (365 п.н.); 7 - PVM (211 п.н.); 10 - PVS (211 п.н.); 16-17 – ПЛР продукти гену фактору елонгації EF1- α (внутрішній контроль); 18- ДНК маркери.

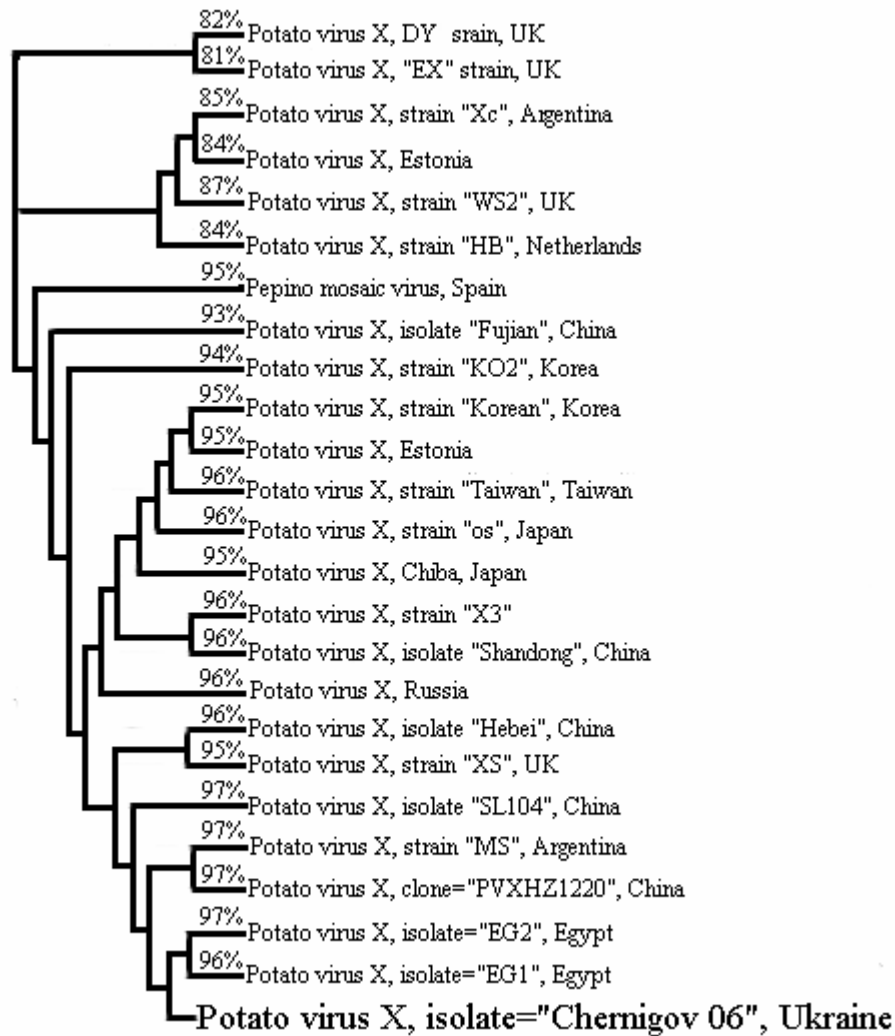


Рис. 2. Дендрограма споріднених вірусів із українським ізолятом PVX. Цифрами вказано процент гомології з українським ізолятом.

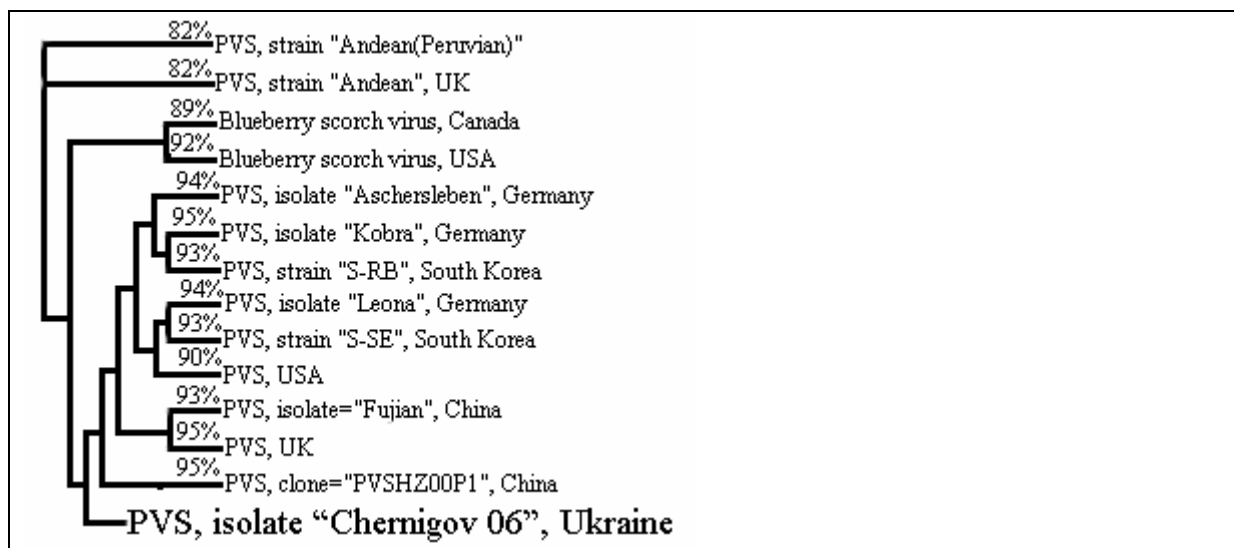


Рис. 3. Дендрограма споріднених вірусів із українським ізолятом PVS. Цифрами вказано процент гомології з українським ізолятом.

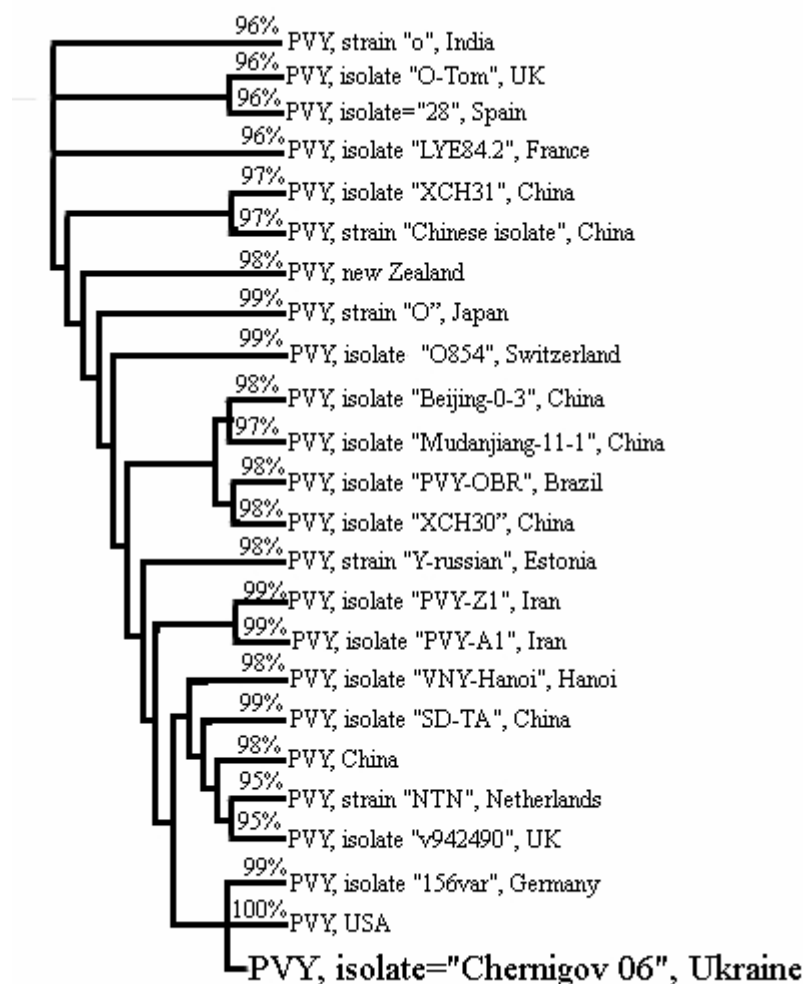
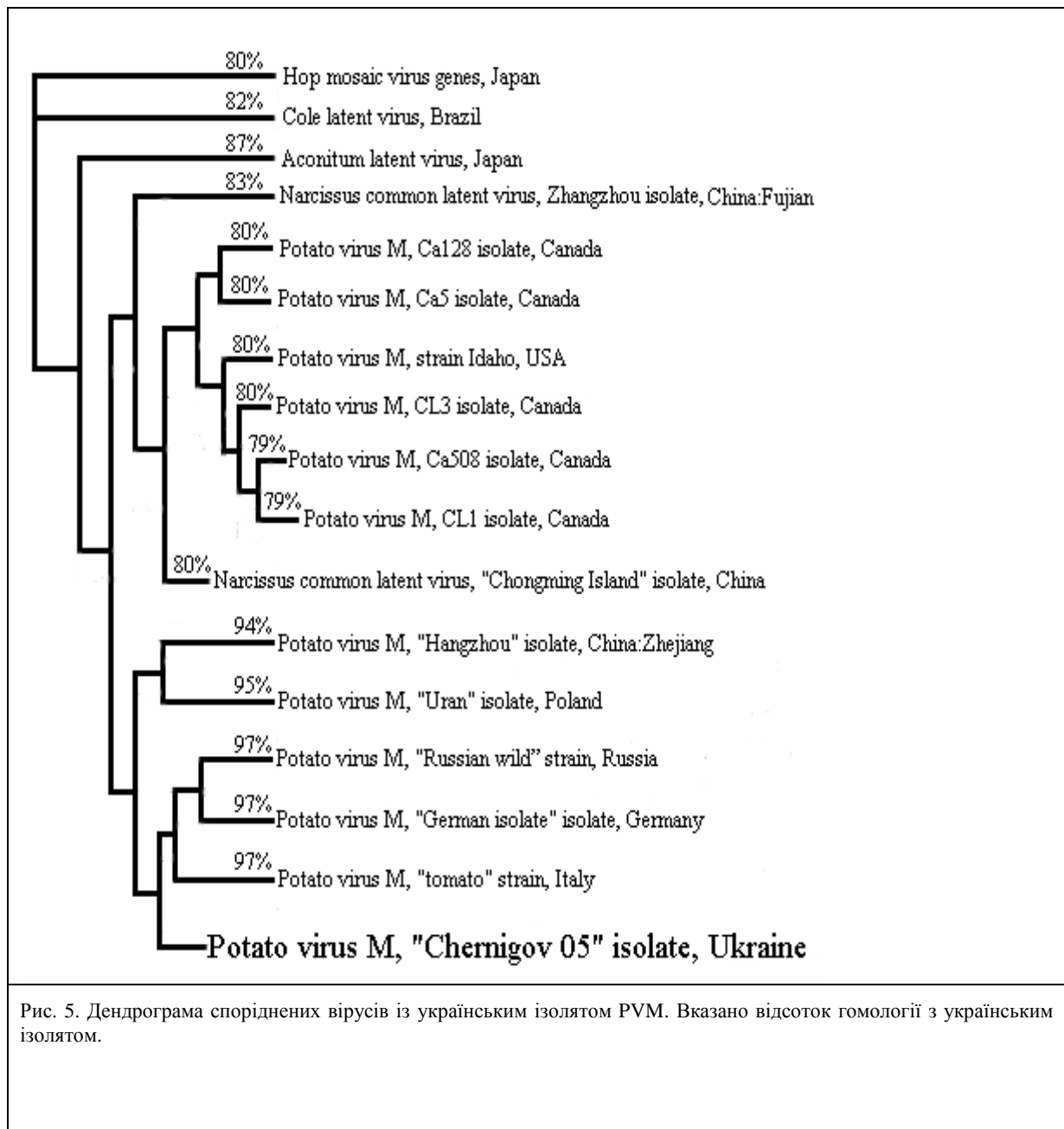


Рис. 4. Дендрограма споріднених вірусів із українським ізолятом PVY. Цифрами вказано процент гомології з українським ізолятом.



В результаті проведення філогенетичного аналізу українських ізолятів вірусів картоплі було показано, що вони займають окреме положення в філогенетичній структурі розповсюдження даних вірусів.

Прикладом практичного використання одержаних даних був синтез специфічних, щодо Y вірусу картоплі нуклеотидних праймерів та

флуоресцентних зондів за допомогою яких відкриваються можливості кількісного та якісного аналізу посадкового матеріалу на ураженість цим шкочочинним латентними вірусом (рис 6).

На рисунку 6 показані графіки ампліфікації вірусних генів PVY, що були виявлені в трьох відібраних зразках у різній кількості: 10^4 , 10^7 та 10^9 копій вірусних генів, відповідно.

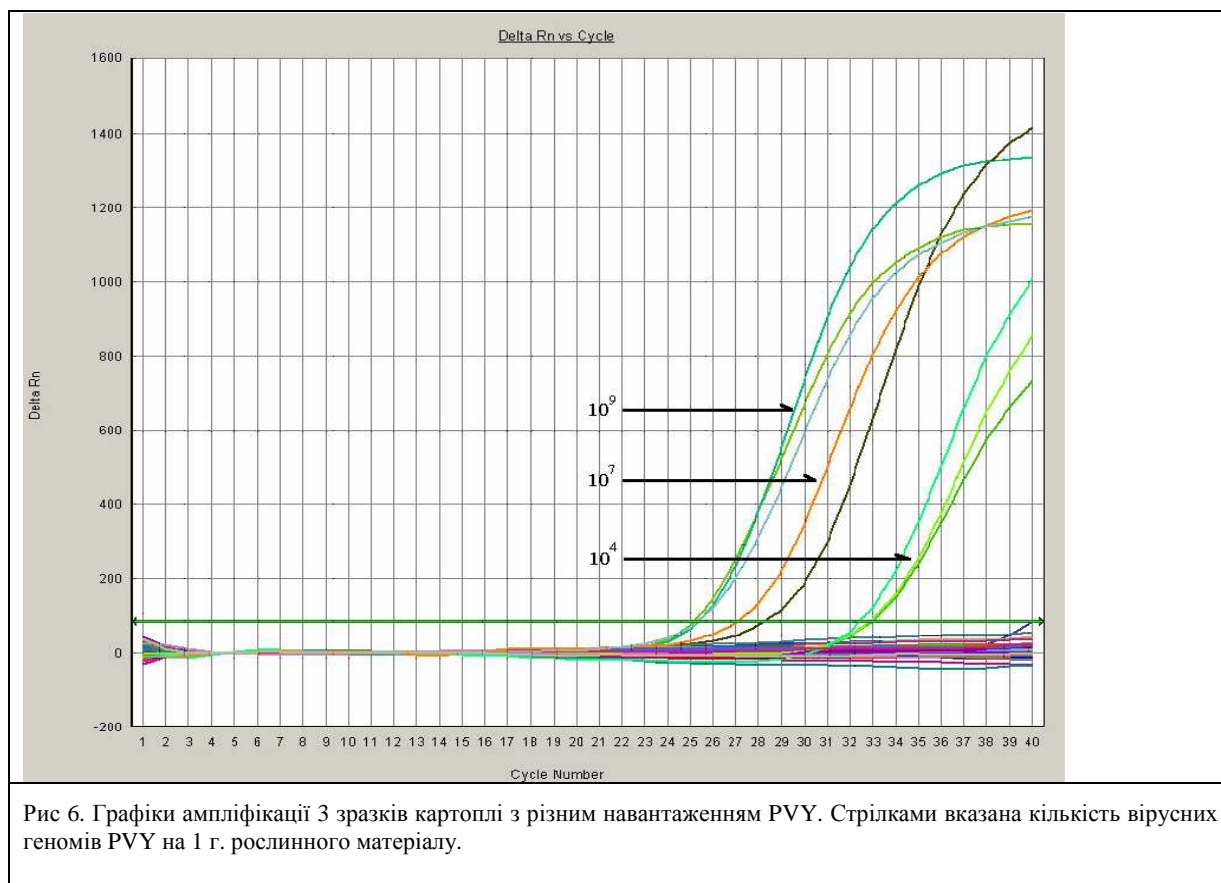


Рис 6. Графіки ампліфікації 3 зразків картоплі з різним навантаженням PVY. Стрілками вказана кількість вірусних геномів PVY на 1 г. рослинного матеріалу.

Висновки

Вперше визначені нуклеотидні послідовності генів капсидних білків українських ізолятів вірусів картоплі (PVX, PVY, PVM, PVS). Проведено філогенетичний аналіз одержаних даних, що підтверджують окреме положення українських ізолятів вірусів картоплі. На основі

отриманих даних була побудована модель кількісного визначення вірусного навантаження PVY в посадковому матеріалі насінневої картоплі. Визначені часткові нуклеотидні послідовності генів, що кодують білки оболонки українських ізолятів вірусів PVX, PVY, PVM були депоновані в GenBank під номерами: [EF043534](#); [DQ890520](#); [DQ883806](#) відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

- Мельничук М.Д., Антипов І.А., Спиридонов В.Г., Мельничук С.Д. Розробка діагностичних тест-систем на виявлення вірусів картопляної групи методом полімеразної ланцюгової реакції // Аграрна наука і освіта. – 2005. – Т.6, № 1-2. – С. 5-8.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. – 1997. – 25. – P. 3389-3402
- Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction method for isolation of plasmid DNA // Methods Enzymol.-1983.-Vol.100.-P.243-255.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2) // Cladistics. – 1989. 5. – P. 164-166.

- Hide GA, 1992. Towards integrated control of potato storage diseases. Aspect of Applied Biology 33, Production and protection of potatoes 1992. Cambridge: AAB, 197-204.
- Marchuk D., Drumm M., Saulino A., Collins F.S. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products // Nucleic Acids Res.-1991.-Vol.19, №5.-P.1154.
- McBride L. J., Caruthers M.H. An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides // Tetrahedron Lett. – 1983. – 24. – P. 245 – 248.
- Nishimura A., Morita M., Nishimura J., Sugino J. A rapid and highly efficient method for preparation of competent E.coli cells // Nucl. acid res.-1990.-Vol.18.-P.61-69.

Отримано: 10 листопада 2006 р.
Прийнято до друку: 10 лютого 2007 р.