

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ГРИНЧУК КАТЕРИНА ВАЛЕРІЇВНА

УДК 581.2+578.2.083.2:633.63

**МОЛЕКУЛЯРНА ДІАГНОСТИКА ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ
НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКУ**

06.01.11 – фітопатологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник кандидат сільськогосподарських наук, доцент
Антіпов Ігор Олександрович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
доцент кафедри агробіотехнологій

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Коваленко Олексій Григорович,
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу вірусів рослин

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Таранухо Микола Павлович,
Інститут садівництва НААН,
старший науковий співробітник відділу
вірусології, оздоровлення та
розмноження плодових і ягідних культур

Захист дисертації відбудеться «16» червня 2016 року о 13⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.02 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий « » травня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

М. С. Мороз

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Вірус некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ) є збудником хвороби ризоманії, яка завдає значних економічних збитків сільському господарству. За ураження цукрового буряку ВНПЖБ, значно зменшується врожайність і цукристість коренеплодів (Манько О. А., 2003; Нурмухаммедов А. К., 2005). Складний життєвий цикл вектора грибної природи, широке поширення основних патотипів та різних штамів призвели до ускладнення контролю розповсюдження ВНПЖБ (Rush С. М., 2003, 2004). ВНПЖБ поширений у всіх регіонах світу, де активно вирощуються буряки (Pferdmenges F., 2007). В Україні ризоманію вперше виявлено у 1997 р. співробітниками Інституту цукрових буряків НААН. У 2003 р. ВНПЖБ з переліку «Карантинних організмів, які відсутні на території України» перенесено до списку «Карантинних організмів, обмежено розповсюджених на території України» (Савчук О., 2007).

Збитки, спричинені ВНПЖБ, можуть бути значно знижені за умови проведення щорічного моніторингу з метою прогнозування можливої появи епіфітотій та розроблення науково та економічно обґрунтованих рекомендацій щодо заходів боротьби з вірусом. Для своєчасного виявлення ВНПЖБ і проведення захисних заходів необхідно використовувати високочутливу, специфічну діагностику. Наразі для виявлення вірусів широко використовуються серологічні системи діагностики, що базуються на ідентифікації вірусних білків та молекулярно-біологічні системи, які засновано на ідентифікації нуклеїнових кислот вірусу.

При створенні тест-систем, які засновуються на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), необхідно враховувати генетичну природу місцевих ізолятів, тому важливим є дослідження особливостей українського ізоляту ВНПЖБ та проведення порівняльного аналізу відомих нуклеотидних послідовностей геномів існуючих у світі ізолятів.

Використання розроблених нами систем діагностики ВНПЖБ, які апробовані на ізолятах, що циркулюють на території України, дозволить знизити витрати карантинних та фітосанітарних служб на закупівлю систем діагностики іноземних виробників.

Отже, для України є актуальним створення універсальних молекулярно-біологічних систем діагностики ВНПЖБ з урахуванням особливостей українського ізоляту, що дозволить проводити своєчасні профілактичні заходи з метою попередження розповсюдження ВНПЖБ, здійснювати більш якісний контроль експортного насіння цукрових буряків.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фітовірусології та біотехнології у межах науково-дослідної роботи: «Біотехнологічні підходи ідентифікації фітопатогенів, генетичної паспортизації, розмноження та переробки цінних сільськогосподарських рослин» (номер державної реєстрації 0113U003828).

Мета і задачі дослідження. Мета роботи полягала в розробленні тест-систем на основі ПЛР для ідентифікації ВМПЖБ з урахуванням молекулярно-біологічних та генетичних особливостей українського ізоляту ВМПЖБ.

Для досягнення мети було поставлено наступні задачі:

- провести скринінг ВМПЖБ в агрофітоценозах України для пошуку позитивного контролю для розробки тест-систем на основі полімеразної ланцюгової реакції;
- здійснити біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей сегментів генома ВМПЖБ, визначити консервативні нуклеотидні послідовності ВМПЖБ та розробити дизайн праймерів для ідентифікації ВМПЖБ та РНК сегментів його генома методом ПЛР, оптимізувати параметри реакції ампліфікації;
- одержати поліклональну сироватку до ВМПЖБ для створення серологічних діагностиків;
- дослідити фізіологічні та біохімічні зміни в рослинах цукрових буряків за ураження ВМПЖБ та змішаної інфекції (вірусної та грибної);
- встановити склад сегментів генома українського ізоляту ВМПЖБ;
- створити банк клонованих фрагментів генів ВМПЖБ для кількісного аналізу вірусних генів в процесі реплікації ВМПЖБ;
- здійснити сиквенс нуклеотидних послідовностей генів ВМПЖБ та провести філогенетичний аналіз українського ізоляту ВМПЖБ на основі поліморфізму нуклеотидних послідовностей генів.

Об'єкт дослідження – якісна і кількісна молекулярна діагностика ВМПЖБ, генетичні особливості українського ізоляту ВМПЖБ.

Предмет дослідження – ВМПЖБ, геном і сегменти генома ВМПЖБ.

Методи досліджень: вірусологічні, молекулярно-біологічні, мікроскопічні, біохімічні, гістохімічні, фізіологічні, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше в Україні встановлено генетичні особливості українського ізоляту ВМПЖБ. Розроблено молекулярно-біологічні прийоми визначення патотипу ВМПЖБ шляхом ідентифікації РНК сегментів генома. Для проведення досліджень особливостей ВМПЖБ, який ізолювано на території України, розроблено діагностичні тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації сегментів генома ВМПЖБ, розроблено дизайн праймерів для ідентифікації протеїнів Р237 на РНК-1; Р75, Р42, Р13, Р15, Р14 на РНК-2, Р25 на РНК-3, Р31 на РНК-4, Р26 на РНК-5. Показано, що геном українського ізоляту ВМПЖБ містить сегменти РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4, сегмент РНК-5 відсутній. Проведено філогенетичний аналіз на основі нуклеотидних послідовностей, що кодуєть ген білка оболонки та фрагмент РНК-1 і показано, що український ізолят ВМПЖБ подібний до ізолятів, які належать до патотипу А. Розроблено систему кількісного аналізу елементів генома ВМПЖБ в уражених рослинах на основі полімеразної ланцюгової реакції за використання плазмідних стандартів із клонованими фрагментами генів ВМПЖБ.

Практичне значення одержаних результатів. Вперше впроваджено в лабораторну практику фітосанітарного контролю ВМПЖБ розроблені

діагностичні ПЛР тест-системи для ідентифікації ВМПЖБ з урахуванням генетичних особливостей українського ізоляту. Запропоновано власну технологію кількісного аналізу ВМПЖБ в рослинному матеріалі.

Апробовано розроблені діагностичні тест-системи на основі ПЛР в наукових установах України, зокрема в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України та в Інституті біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН.

Результати досліджень використовуються під час проведення лабораторних робіт із загальних курсів дисциплін: «Сільськогосподарська вірусологія», «Екологія біологічних систем (вірусологія)», «Загальна вірусологія», «Молекулярна вірусологія», «Протеоміка і геноміка вірусів» в НУБіП України. Розроблено методичні рекомендації: «Молекулярна діагностика та ідентифікація вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку», які можуть бути використанні в діагностичній практиці в лабораторіях державної інспекції з карантину рослин України.

Особистий внесок здобувача. Роботу виконано в проблемній лабораторії фітовірусології і біотехнології НУБіП України. Здобувачем самостійно проведено інформаційний пошук, проаналізовано літературні дані, проведено біологічне тестування, електронну мікроскопію, отримано антисироватку до ВМПЖБ, підготовлено проби, створено стандарти для кількісного визначення вірусного генома у досліджуваному матеріалі, проведено дизайн праймерів, створено діагностичні тест-системи на основі ПЛР, випробувано діагностичні тест-системи та підтверджено їх ефективну роботу, оптимізовано умови проведення ПЛР, створено системи кількісної оцінки генома ВМПЖБ у рослинному матеріалі.

Моніторинг ВМПЖБ на території України здійснено спільно із провідним фахівцем сектору вірусології Державної установи «Центральна фітосанітарна лабораторія» М. В. Єрмолаєвим. Визначення часткових нуклеотидних послідовностей генів ВМПЖБ здійснено разом з кандидатом біологічних наук М. Ф. Парієм. Проведення цитологічного та біохімічного аналізу здійснено разом з кандидатом біологічних наук, доцентом А. Ф. Ліхановим. Дизайн праймерів, створення діагностичних тест-систем, планування експериментів, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи, підготовку публікацій за отриманими результатами проведено за участю наукового керівника кандидата сільськогосподарських наук, доцента І. О. Антіпова.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи було представлено на Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми наук про життя та природокористування» (м. Київ, 2013 р.); X міжнародній науково-практичній конференції «Дні науки» (м. Прага, Чеська Республіка, 2014 р.); XI міжнародній науково-практичній конференції «Фундаментальні і прикладні науки» (м. Шеффілд, Велика Британія, 2014 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, з яких 3 статті у фахових виданнях України, 2 статті у фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті у інших виданнях, 3 тези наукових доповідей, методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел, що включає 261 найменування з них 209 латиницею та додатків. Робота викладена на 186 сторінках комп'ютерного тексту. Фактичний матеріал дисертації подано на 71 рисунках та в 13 таблицях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто біологічні характеристики та особливості генома ВВПЖБ. Наведено інформацію про циркуляцію патотипів А, В та Р в залежності від особливостей генома та присутності певних РНК-сегментів. Проаналізовано наявну наукову літературу щодо існуючих способів діагностики та ідентифікації ВВПЖБ. Обґрунтовано надійність використання молекулярно-біологічних методів діагностики ВВПЖБ на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) порівняно із серологічними методами, біотестом та електронною мікроскопією. Наведено існуючу на сьогодні інформацію щодо циркулюючих патотипів ВВПЖБ та обґрунтовано важливість їх ідентифікації для контролю поширення на території України.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Діагностику та ідентифікацію ВВПЖБ проводили з використанням комерційного набору для проведення імуноферментного аналізу (Sediag, Французька Республіка) згідно з рекомендаціями виробника. Біологічне тестування зразків на наявність ВВПЖБ проводили на рослинах цукрового буряку (*Beta vulgaris* L., var. *saccharifera*), шпинату новозеланського (*Tetragonia expansa* L.), лободи стінної (*Chenopodium murale* L.), гомфрени шаровидної (*Gomphrena globosa* L.) та дурману індійського (*Datura metel* L.). Для електронної мікроскопії використовували мідні сіточки з формваром, на які наносили краплю вірусного препарату. Контрастували 2 % розчином ураніл ацетату. Отримані препарати досліджували в електронному трансмісійному мікроскопі JEM 1400. Очищення та концентрування ВВПЖБ проводили модифікованим методом за М. Žižytė (Žižytė M., 2009). Поліклональні антитіла були отримані після імунізації кроля. Для проведення тестування отриманих антитіл здійснювали непрямий імуноферментний аналіз із різними розведеннями антитіл.

Сумарну РНК виділяли за допомогою комерційного набору «РИБО-сорб» (AmpliSens, Російська Федерація), реверс транскрипцію – «Реверта-L-100» (AmpliSens, Російська Федерація), згідно з рекомендаціями виробників. Дизайн праймерів здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Primer3». Синтез праймерів проведено комерційною компанією «Біолабтех ЛТД» (Київ, Україна). ПЛР виконували за таких умов: початкова денатурація 5 хв за 94 °С; та 30 циклів: 94 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 30 с. Продукти ампліфікації розділяли, використовуючи горизонтальний електрофорез у 1,5 % агарозному гелі в присутності 1 % розчину бромового етидію. Очистку продуктів ампліфікації здійснювали комерційним набором «ДНК-сорб» (AmpliSens, Російська Федерація), згідно з рекомендаціями виробника. Клонування нуклеотидних

послідовностей у плазмідні вектори проводили з використанням комерційного набору (ThermoFisher Scientific CloneJET PCR Cloning, США) згідно з рекомендаціями виробника. Приготування компетентних клітин *Escherichia coli* та їхню трансформацію плазмідною ДНК проводили за методом Nishimura A. (Nishimura A., 1990). Для вирощування трансформованих клонів використовували поживне середовище Luna-Bertam із додаванням селективних маркерів: ампіциліну (250 мкг/мл) або тетрацикліну (50 мкг/мл). Плазмідну ДНК виділяли методом, який запропонував Н. С. Birnboim (1983). Нуклеотидну послідовність ПЛР-фрагментів визначали на генетичному аналізаторі ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) з використанням набору BigDye®terminator, v.3,1, відповідно до інструкції виробника.

Локалізацію пероксидази в тканинах листків цукрових буряків визначали стандартними гістохімічними методами. Фотодокументацію отриманих даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Camera Control Pro 2. Активність пероксидази визначали спектрофотометричним методом за Бояркіним. Статистичну обробку даних виконували у програмному модулі Microsoft Office Excel. Вміст фенольних сполук у метанольних екстрактах (v/v–1/10) листків і коренеплідів цукрових буряків досліджували на сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop із використанням реактиву Фоліна-Чекольтеу.

Порівняння сиквенованих нуклеотидних послідовностей проводили з використанням генетичного банку даних (GenBank) Національного центру біотехнологічної інформації США. Вирівнювання фрагментів нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою програмних пакетів Multaline та ClustalW. Філогенетичні дерева амінокислотних і нуклеотидних послідовностей будували за методом максимальної подібності на основі моделі Jones-Taylor-Thornton, методом максимальної парсимонії на основі моделі Tree bicetion reconnection, методом найближчих сусідів на основі моделі Кімури. Статистичну вірогідність топології філограм визначали за допомогою бутстреп аналізу, значення якого обчислювали на основі 1000 бутстреп реплікацій за допомогою програмного пакету Megab.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВНПЖБ

Розробка ПЛР тест-систем для діагностики та ідентифікації ВНПЖБ передбачає використання позитивного контролю. Було відібрано зразки цукрових буряків в агрофітоценозах Чернівецької (Заставнівський район), Черкаської (Маньківський, Корсунь-Шевченківський, Золотоніський, Уманський райони), Чернігівської (Бобровицький, Прилуцький, Ічнянський, Носівський райони), Хмельницької (Красилівський, Чемеровецький, Старокостянтинівський, Старосинявський райони), Тернопільської (Гусятинський, Заліщицький, Тербовлянський, Бучацький, Чортківський райони), Вінницької (Барський, Тростянецький, Томашпільський, Хмільницький райони), Житомирської (Попільнянський, Андрушівський, Бердичівський, Житомирський райони), Рівненської (Острозький, Рівненський, Гоцанський, Радивилівський, Дубенський

райони), Київської (Васильківський, Згурівський, Баришівський, Яготинський райони) областей України. В результаті проведеного імуноферментного аналізу бічних корінців цукрових буряків виявлено присутність білкових компонентів ВПЖБ в середньому зразку, який було відібрано в Чемеровецькому районі Хмельницької області. Показник оптичної густини після експозиції впродовж 1 год становив 3,052, що знаходиться в межах позитивного контролю (рис.1).

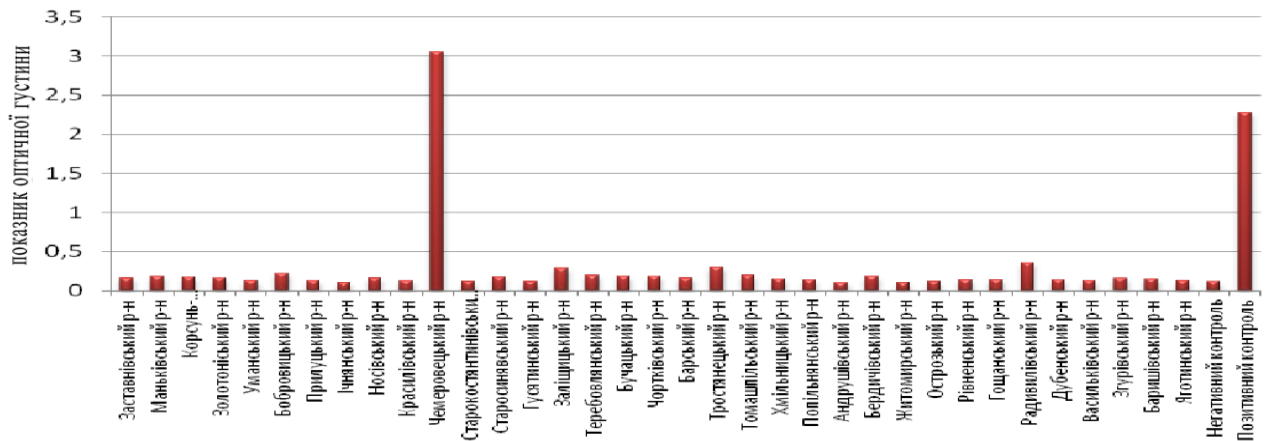


Рис. 1. Діаграма імуноферментного аналізу зразків цукрових буряків, відібраних в агрофітоценозах України

На листках рослин цукрових буряків, у яких методом ІФА встановлено наявність ВПЖБ, відмічали пожовтіння та некротизацію жилок. Деякі коренеплоди були зменшені в розмірах порівняно з контрольною рослиною цукрового буряку та мали аномалії розвитку у вигляді розгалуження та відростання бічних корінців (рис. 2).



Рис. 2. Листок і коренеплід цукрового буряку з симптомами ураження

Було проведено інокуляцію рослин-індикаторів гомогенатом листків зразку цукрового буряку, який інфіковано ВПЖБ (рис. 3–5).

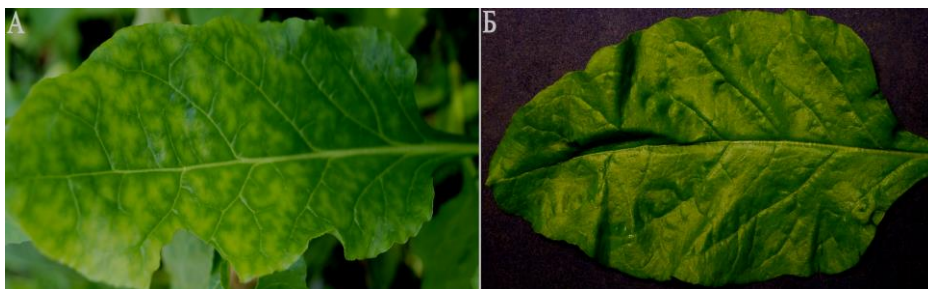


Рис. 3. Листкові пластинки рослин-індикаторів *B. vulgaris var. saccharifera*: А – мозаїка на поверхні листової пластинки (21 доба після інокуляції); Б – контроль (без симптомів ураження).

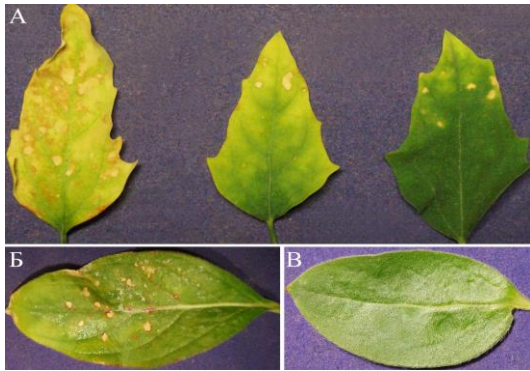


Рис. 4. Листкові пластинки рослин-індикаторів: А – *C. murale*, симптоми ураження у вигляді некрозів на поверхні листкової пластинки (12 доба після інокуляції); Б – *G. globosa*, некрози на поверхні листкової пластинки (14 доба після інокуляції); В – *G. globosa*, контроль (без симптомів ураження).

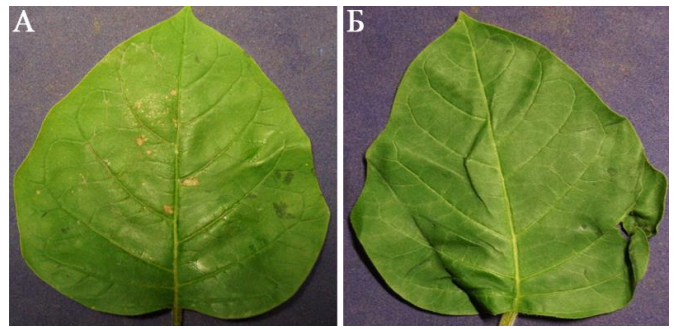


Рис. 5. Листкові пластинки рослини-індикатора *D. metel*: А – некрози на поверхні листкової пластинки (14 доба після інокуляції); Б – контроль (без симптомів ураження).

Симптоми ураження фіксували на 8–21 добу після проведення інокуляції рослин-індикаторів (табл. 1).

Таблиця 1

Реакція рослин-індикаторів на ураження ВПЖБ

Рослини-індикатори	Симптоми
<i>B. vulgaris</i> var. <i>saccharifera</i>	На інокульованих листках на 8 добу з'явилася мозаїка, жилки листкових пластинок світліли
<i>C. murale</i>	З'являлися численні місцеві некрози на 12 добу після інокуляції з чітким центром і коричневою облямівкою. Системна реакція проявлялася на всіх пагонах: листки жовтіли, вкривалися некрозами та відмирили
<i>T. expansa</i>	На 12 добу після інокуляції на листкових пластинках з'являлися плями, які поступово через декілька днів некротизувалися
<i>G. globosa</i>	На листкових пластинках з'являлися численні некрози, на 14 добу навколо них формувалася червона облямівка після інокуляції
<i>D. metel</i>	На листкових пластинках на 14 добу після інокуляції з'являлися некрози з коричневою облямівкою

Для очищення ВПЖБ було використано рослини-індикатори *B. vulgaris* var. *saccharifera*, які проявили системну реакцію на ураження вірусом. Отримано очищений препарат вірусу в концентрації 5 мг/мл. Також було підтверджено інфекційну природу захворювання рослин цукрових буряків за тріадою Коха.

Показано в очищеному вірусному препараті наявність паличковидних віріонів ВНПЖБ діаметром 20 нм та довжиною близько 390 (рис. 6).

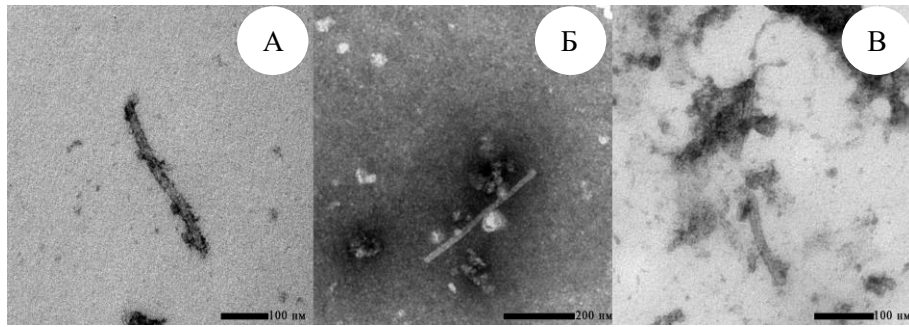


Рис. 6. Електронोगрами ВНПЖБ: контрастування 2 % розчином УА ($\times 60$ тис. раз, бар А – 100 нм, Б – 200 нм, В – 100 нм).

Таким чином отримано позитивний зразок ВНПЖБ для розробки систем на основі ПЛР-аналізу.

Очищений препарат ВНПЖБ зберігав достатню інфекційність, мав достатню ступінь очистки та концентрацію, яка необхідна для отримання специфічної антисироватки для ідентифікації ВНПЖБ. Отримано поліклональну сироватку, що містила специфічні до ВНПЖБ антитіла в титрі 1:6400.

Для створення універсальної діагностичної ПЛР тест-системи використано консервативні ділянки нуклеотидної послідовності гена Р21, що знаходиться на РНК-2 і кодує білок оболонки (БО) ВНПЖБ. Проведено біоінформативний аналіз та порівняння 66 нуклеотидних послідовностей гена БО ВНПЖБ, який включав скринінг послідовностей генів вірусу, що депоновані в генетичний банк даних (GenBank). В результаті вирівнювання нуклеотидних послідовностей виявлено поліморфні та консервативні ділянки гена Р21. Консенсусну послідовність використано для дизайну олігонуклеотидних праймерів (рис. 7).

```

145 ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAaGTTTTATGACCGATCGATGGGCcCGTGTTCGGACGTCG
TGAGTGTТАТТАААСААТСГСАТГСТАТGGACTTGTCCAAAGGCTGCGAATСТАТСТАТААТТААААСТGCTTTGGCAGGATTAGGCTCGGG
TTGGaSTGACAATAATCSTTTTGTGTCcCGGATGACCCGTTTTCCACAGACASTAАСТATGTAcGGTGCaSTTGTGTТАТATGTTAATСТG
TCtGACCCAGAATTTGCGTTGATAATGASTAAGgTAAgTACTTTAАСТGATTCAGGGTTAGCAGATAAtGCATCTGСТАATGTgCGTAGAG
ATGTGGTGTCCGGAAaATAAAGCCGAATCATCCGGTAAААСТGCTGGcASTAATGAGAAtTCTGCTTAtACGCTTACcGTtAGTCTTGCTGG
TTTTgGCTCAAGCTCTTAGGCTTGAgGAATTAATGTGGACtCGGGATAAgTTTGAGGACCGGTTgAAaTTACCATGGACACSTGTTCАAGGT
AGAACCAGTCCACCCGGACAATAG 711

```

Рис. 7. Результат вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена Р21, що кодує БО ВНПЖБ: консервативні (заглавні літери), поліморфні (прописні підкреслені літери) ділянки генома.

Для створення універсальної діагностичної ПЛР тест-системи поліморфні ділянки генома виключалися з аналізу. Для досягнення суворої специфічності тест-системи та унеможливлення появи хибнонегативних результатів ми використовували консервативні фрагменти відкритої рамки зчитування (ВРЗ) Р21. Також враховували універсальні вимоги до праймерів: нуклеотидний склад праймера 40–60 % дезоксигуанозин-5'-фосфату та дезоксицитидин-5'-фосфату (GC-склад); на 3'-кінці праймера останні 2–4 нуклеотиди дезоксиаденозин-5'-фосфат (А) або дезокситимідин-5'-фосфат (Т); праймери не повинні формувати стабільні шпилькові структури та димери, суворо специфічні до одного вірусу;

на 3'-кінці праймера повинні містити як мінімум два нуклеотиди, які не гомологічні нуклеотидній послідовності геномів таксономічно близьких вірусів; температура відпалу праймера близько 60 °С і вище. Дизайн праймерів здійснювали в широкому діапазоні продуктів ампліфікації 100–1000 п. н. Праймери підбирали таким чином, щоб розбіжність температур відпалу обох праймерів була найнижчою. Підібрані праймери перевіряли на можливість утворення шпильок та димерів. Для синтезу обрано пару праймерів та присвоєно відповідні назви: BNYVV1 (F5) 5'-ttcggacgtcgtgagtgtta-3' та BNYVV2 (R5) 5'-cccagatccacattaattcc-3'. Розроблену ПЛР тест-систему апробовано з використанням кДНК українського ізоляту ВНПЖБ та підтверджено її ефективну роботу. Після проведення ПЛР виявлено амплікони розміром 419 п. н., що відповідали очікуванім (рис. 8, А).

Оптимізовано роботу ПЛР-системи за температурою відпалу праймерів та встановлено, що температура в межах 54–62 °С не впливала на результати реакції ампліфікації (рис. 8, Б). Оптимальна концентрація іонів Магнію для ефективної роботи ферменту Таq-полімерази, за якої не відбувалося утворення неспецифічних смуг ампліконів і відмічався найвищий вихід продуктів ампліфікації, становила 1,8 мМ (рис. 8, В).

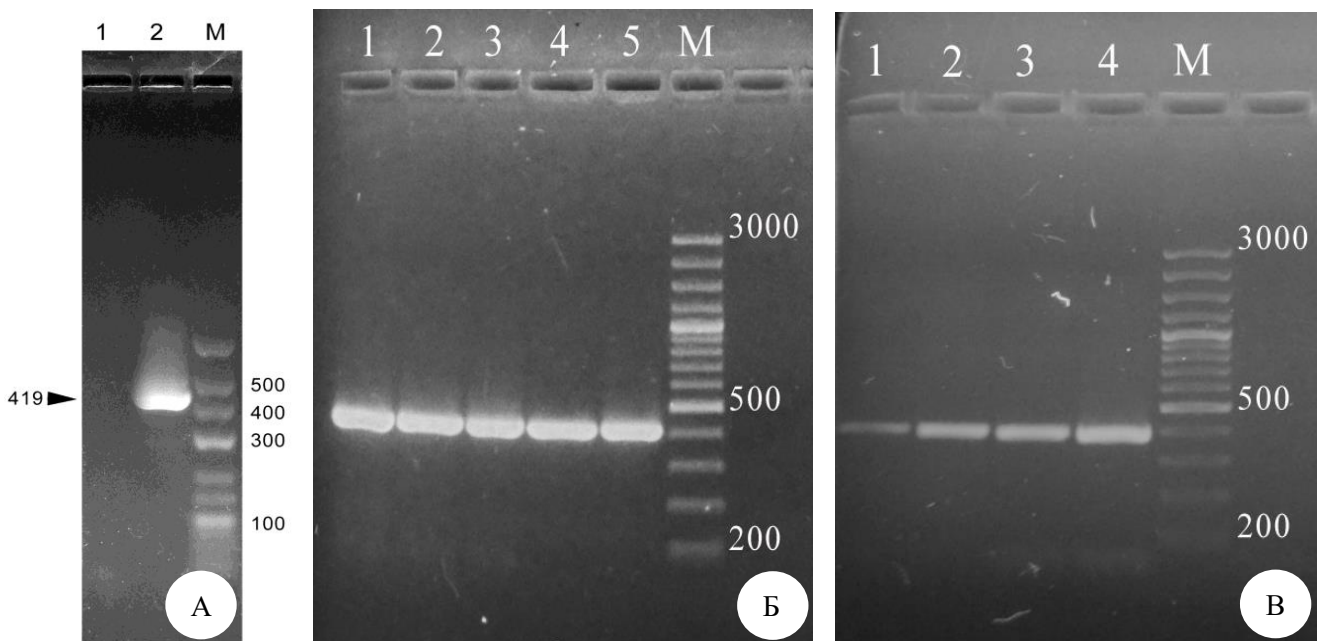


Рис.8. Електрофореграми: А) продукту ПЛР-аналізу визначення ВНПЖБ в ураженому зразку цукрового буряку, відбраного в Чемеровецькому районі Хмельницької області, де 1 – негативний контроль, 2 – зразок, М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 1203) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів); Б) продуктів ПЛР-аналізу визначення ВНПЖБ з різними температурами гібридизації праймерів: 1 – 54 °С; 2 – 56 °С; 3 – 58 °С; 4 – 60 °С; 5 – 62 °С; М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0321) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів). В) продуктів ПЛР-аналізу визначення ВНПЖБ із різними концентраціями іонів Магнію в реакційній суміші: 1 – 1,3 мМ; 2 – 1,8 мМ; 3 – 2,0 мМ; 4 – 2,5 мМ; М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0321) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

МОРФО-ФІЗІОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ПАТОГЕНЕЗУ РОСЛИН ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА УМОВ ЗМІШАНИХ ІНФЕКЦІЙ

За умов змішаної інфекції у рослин цукрових буряків виявлено типові симптоми вірусного патогенезу: пожовтіння центральної і бічних жилок адаксиальної поверхні листків, порушення геометрії метамерів (збільшення індексу співвідношення довжини до ширини листових пластинок асиметричність їх форми тощо), мозаїчна депігментація, некротичні плями і проривні перфорації, які утворювалися на завершальних стадіях реакції надчутливості рослини. Захисні реакції рослин проти фітопатогенів супроводжувались активацією вільних і слабкозв'язаних аніонних і катіонно-аніонних пероксидаз, що беруть участь у розвитку реакцій індукованого неспецифічного імунітету, формуванні тканинних бар'єрів через полімеризацію фенольних сполук і лігніфікацію клітинних стінок. У жилках безсимптомних рослин, в яких за використання ІФА і ПЛР-діагностикумів досліджували віруси не виявлено, пероксидаза накопичувалась у пероксисомах поодиноких клітин паренхіми первинної кори (рис. 9, 10).

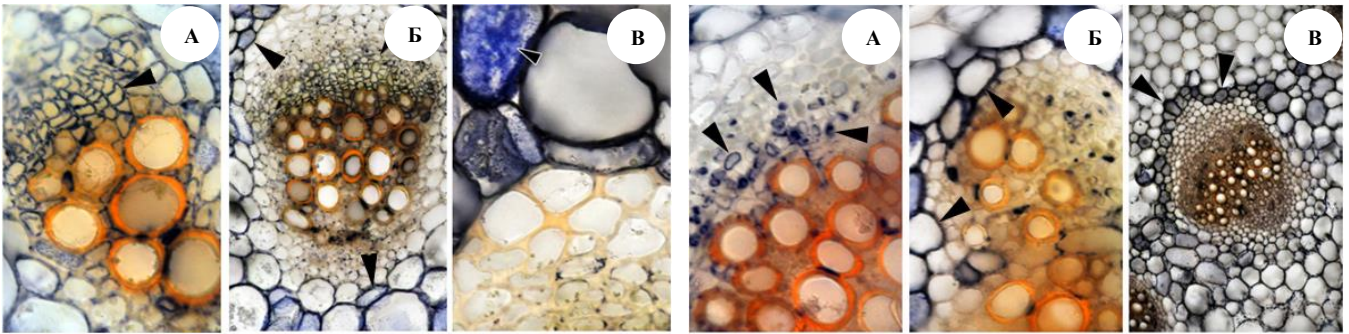


Рис. 9. Локалізація пероксидази в тканинах провідних пучків і паренхіми центральних жилок листків безсимптомних рослин цукрових буряків: А, Б – провідний пучок, у якому пероксидаза виявляється в клітинних стінках флоєми і в паренхімі, що його оточує (стрілками позначено локалізацію пероксидази); В – клітина паренхіми кори з високим вмістом ферменту.

Рис. 10. Локалізація пероксидази в тканинах провідних пучків і паренхіми центральних жилок листків цукрових буряків із симптомами ураження: А – фрагмент провідного пучка (стрілками позначено підвищений вміст пероксидази у ситоподібних трубках); Б – підвищена активність пероксидази, яка зв'язана з клітинними стінками паренхіми (стрілками позначено пероксидазу, що зв'язана із клітинними стінками); В – зосередження пероксидази в клітинних стінках перициклу.

В провідних пучках фермент нагромаджувався в матриці клітинних стінок ендокортексу, а також камбіальних клітин відкритих колатеральних пучків. Розвиток патогенної трансформації тканини супроводжувався вивільненням пероксидази, яка дифузно розподілялася в протопластах клітин флоєми, а також нагромаджувалася в клітинних стінках обкладинки провідних пучків. Встановлено, що за ознаками ураження рослин грибами, на фоні вірусних інфекцій спостерігалось значна трансформація процесів вторинного метаболізму. Під дією фітопатогенів у запасуючих тканинах коренеплодів виявлялись специфічні

середньополярні сполуки класу терпеноїдів і тритерпенових глікозидів (рис. 11). Окрім фенольних сполук важливе місце у формуванні системи захисту рослини займають терпеноїди і сапоніни.

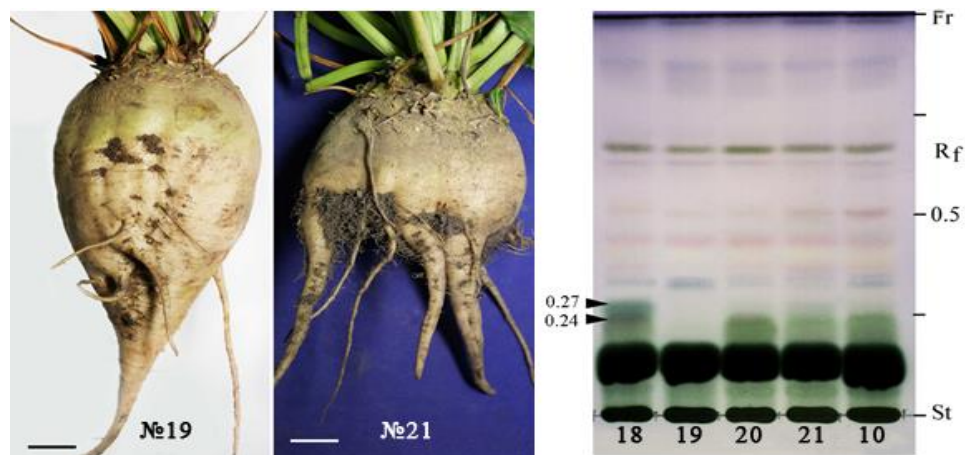


Рис. 11. Високоєфективна тонкошарова хроматографія EtOH-екстрактів коренеплодів цукрових буряків за умови змішаної інфекції: № 18 – рослина, що уражена грибом *Alternaria tenuissima*, ВНПЖБ, ВМБ; № 19 – безсимптомна рослина; № 20, № 21, № 10 – рослини, які уражені вірусами ВНПЖБ, ВМБ (система: хлороформ-оцтова кислота-метанол-вода, v/v/v/v – 32/12/8/4; обробка хроматограми анісовим альдегідом).

В ході біохімічного профілювання вдалось встановити, що під дією фітопатогенів у запасуючих тканинах коренеплодів цукрових буряків виявляються специфічні середньополярні сполуки. В безсимптомних рослин виділені речовини не накопичувались. Отже, дані вторинні метаболіти, ймовірно, системно пов'язані з патогенезом і потенційно є біохімічними маркерами інфекційних процесів у рослинному організмі.

РОЗРОБКА СИСТЕМ ДІАГНОСТИКИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ СЕГМЕНТІВ ГЕНОМА ВНПЖБ ТА ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВНПЖБ

Для проведення досліджень особливостей генома українського ізоляту ВНПЖБ розроблено діагностичні тест-системи на основі ПЛР для ідентифікації його сегментів. Використовуючи літературні дані та генетичну базу даних NCBI, здійснювали пошук сиквенованих сегментів нуклеотидних послідовностей генома ВНПЖБ РНК-1 (Р Р237), РНК-2 (Р75, Р42, Р13, Р14, Р15), РНК-3 (Р25), РНК-4 (Р31) та РНК-5 (Р26) з метою проведення біоінформативного аналізу та встановлення консервативних послідовностей кожного гена. Здійснено біоінформативний аналіз депонованих в генетичну базу даних NCBI нуклеотидних послідовностей (н. п.) фрагментів для РНК-1: 20 н. п. (Р237); для РНК-2: 17 н. п. – Р75, 7 н. п. – Р42, 20 н. п. – Р13, 10 н. п. – Р15, 5 н. п. – Р14; для РНК-3: 333 н. п. – Р25; для РНК-4: 202 н. п. – Р31; для РНК-5: 124 н. п. – Р26. Встановлено рівень консервативності нуклеотидних послідовностей генів ВНПЖБ, який складав для Р237 – 98, Р75 – 93,7, Р42 – 96,2, Р13 – 95,8, Р14 – 97,7, Р15 – 94,5, Р25 – 96,5, Р31 – 97,4, Р26 – 94,5 %. Для дизайну відповідних пар

праймерів відбирали суворо консервативні фрагменти кожного з генів генома ВНПЖБ. Пари праймерів, які відповідали вимогам було синтезовано (табл. 2).

Таблиця 2

Характеристики ПЛР-праймерів для діагностики та ідентифікації сегментів ВНПЖБ

Сегмент РНК	ВРЗ	Назва праймера	Нуклеотидна послідовність 5'-3'	Розмір продукту ампліфікації, п. н.	Ступінь консервативності, %	Кількість проаналізованих ізолятів, шт.
РНК-1	P237	P237-F	agcgggaatcagtggcaaga	803	98	20
		P237-R	accatcatcgcccttcatgg			
РНК-2	P21	BNYVV1	ttcggacgtcgtgagtgtta	419	95,6	66
		BNYVV2	cccgagtccacattaattcc			
	P75	P75-F	ctttggcaggattaggctcg	490	93,7	17
		P75-R	cactcgggactatcaccagg			
	P42	P42-F	aaacccggacattgcgattg	326	96,2	7
		P42-R	accagaaaagtgtccaaccg			
	P13	P13-F	tgtattgctggcgttcatgc	175	95,8	20
		P13-R	tcgactactaacgctacccc			
	P15	P15-F	gtgaccgttcgtgtgtgac	76	94,5	10
		P15-R	aaaacaccgccaacccaac			
P14	P14-F	gggatctgaaagtgttgagg	274	97,7	5	
	P14-R	acaatcaccgcaaacaccta				
РНК-3	P25	P25-F	tgtgggttcgtgccttatg	424	96,5	333
		P25-R	cgtcaggggcttgaataacatt			
РНК-4	P31	P31-F	gctaggatggtgcagaaacg	693	97,4	202
		P31-R	atcacaaaacctcgccacc			
РНК-5	P26	P26-F	atatgtggcttgtgttgctagt	100	94,5	124
		P26-R	cacaggtcgttgccaaaatct			

Проведено ідентифікацію сегментів генома ВНПЖБ методом ПЛР-аналізу. Після електрофоретичного розділення зафіксовано продукти ампліфікації, що відповідали очікуваним розмірам: P237 – 803 п. н.; P75 – 490 п. н.; P13 – 175 п. н.; P42 – 326 п. н.; P14 – 274 п. н.; P15 – 76 п. н.; P25 – 424 п. н.; P31 – 693 п. н. (рис. 12, А). Таким чином встановлено наявність в геномі українського ізоляту ВНПЖБ сегментів: РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. Проведено ПЛР-аналіз із використанням праймерів: Forward ⁴⁶⁸gatatggcatatagcgacg⁴⁸⁶, Reverse ¹⁰⁴⁹ggtcgttgccaaaatctc¹⁰⁶⁶ (Koenig R., 1997) для ідентифікації РНК-5 із розміром продукту ампліфікації 530 п. н. та підтверджено, що в геномі українського ізоляту ВНПЖБ відповідний сегмент РНК відсутній (рис. 12, Б). Для мультиплексного

ПЛР-аналізу використано системи ідентифікації генів P237, P75, P25, P31, що розташовані в межах окремих РНК-сегментів ВНПЖБ (рис. 12, В).

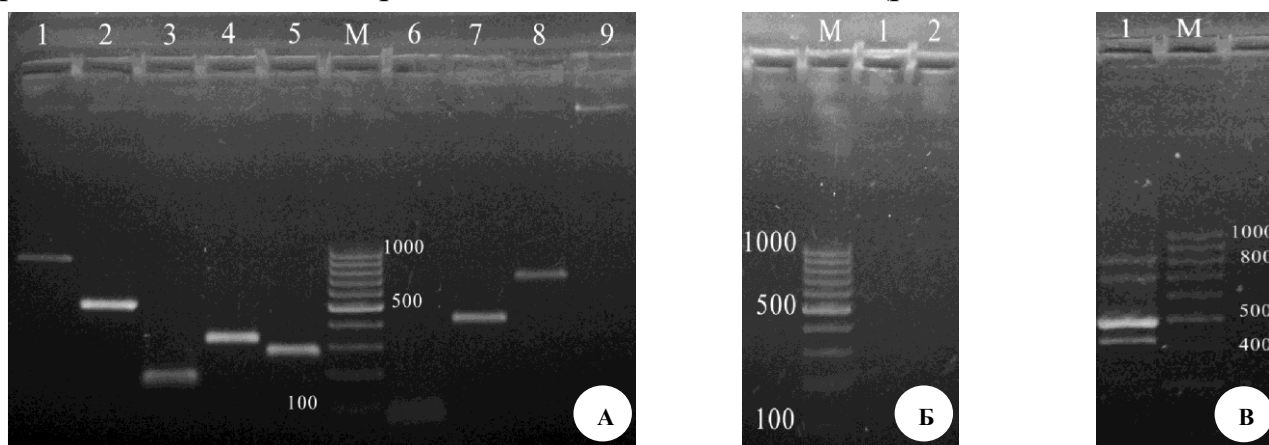


Рис. 12. Електрофореграма визначення сегментів РНК ВНПЖБ: А) 1 – P237; 2 – P75; 3 – P13; 4 – P42; 5 – P14; 6 – P15; 7 – P25; 8 – P31; 9 – P26; Б) 1 – P26, 2 – праймери, які запропоновані Koenig R., 2 – P26; В) 1 – визначення сегментів РНК ВНПЖБ методом мультиплексного ПЛР-аналізу (М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)).

Отже, за результатами досліджень встановлено, що український ізолят ВНПЖБ містить 4 сегмента РНК і, можливо, належить до патотипу А або В.

Роботу розроблених системи діагностики для ідентифікації генів P237 (РНК-1), P75 (РНК-2), P25 (РНК-3), P31 (РНК-4) оптимізовано за температурою відпалу праймерів та показано, що температура в діапазоні 50–60 °С на ефективність реакції ампліфікації суттєво не впливала (рис. 13).

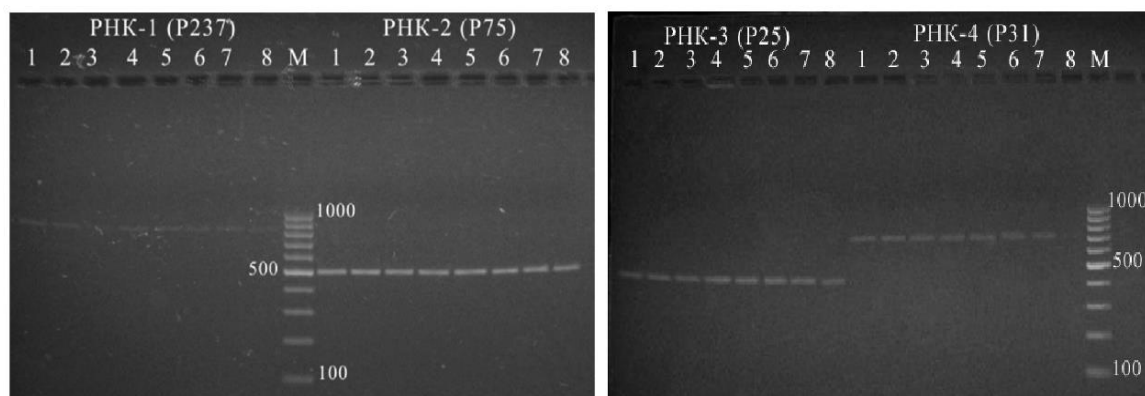


Рис. 13. Електрофореграми оптимізації температури відпалу праймерів для ідентифікації сегментів РНК ВНПЖБ: 1 – 50 °С; 2 – 52 °С; 3 – 54 °С; 4 – 56 °С; 5 – 58 °С; 6 – 60 °С; 7 – 62 °С; 8 – 64 °С; М (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

Наступним етапом наших досліджень було створення системи кількісної оцінки генома ВНПЖБ методом ПЛР. Для здійснення цієї мети створено плазмідні стандарти для визначення кількісного накопичення генома ВНПЖБ у рослинному матеріалі.

Проведено молекулярне клонування фрагментів генома ВНПЖБ у плазмідний вектор pJet1.2/blunt. Фрагменти для клонування отримано методом ПЛР з використанням розроблених олігонуклеотидних праймерів. Проведено генетичну трансформацію бактерій *E. coli* плазмідами із клонованими фрагментами генома ВНПЖБ. Після вирощування трансформованих клітин та виділення плазмід із вставками, їх концентрація з фрагментом гена P237 становила 184,31 нг/мкл, P75 72,53 нг/мкл, P42 376,15 нг/мкл, P15 107,57 нг/мкл, P14 967,33/мкл, P13 127,02 нг/мкл, P25 275,55 нг/мкл, P31 72,21 нг/мкл. Встановлювали кількість реплікованих фрагментів у зразку рослин, інфікованих ВНПЖБ, для дослідження процесів реплікації генів ВНПЖБ. Для цього готували стандартні розведення плазмід із клонованими фрагментами генома ВНПЖБ та проводили серію реакцій ампліфікації (рис. 14).

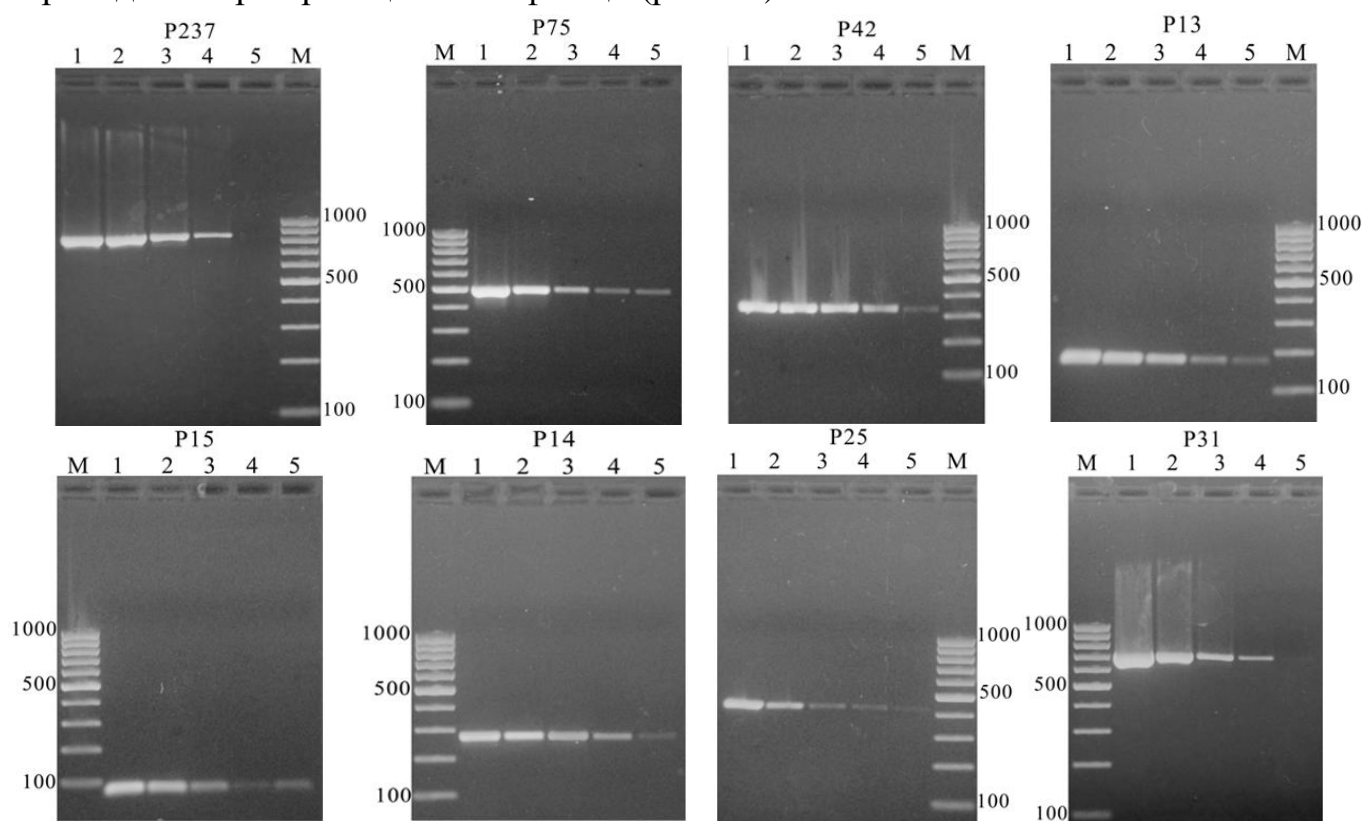


Рис. 14. Електрофореграми ампліфікації серії розведень плазмід із вставками фрагментів генів: P237; P75; P42; P13; P15; P14; P25; P31.

За показниками флуоресценції продуктів ампліфікації у зразках із відомими вихідними концентраціями ДНК мішеней будували калібрувальну криву, за якою встановлювали відносну кількість копій гена вірусу в уражених клітинах (рис. 15). Такі калібрувальні криві побудовано для кожного гена ВНПЖБ. Таким чином, показано, що нуклеотидні послідовності, які кодують ген P14 ВНПЖБ, представлені в уражених рослинах у найвищій концентрації. Кількість P14 в 1 мкл кДНК, отриманої з уражених рослин цукрових буряків, складала 1472×10^2 копій, що майже в тисячу разів перевищує концентрацію гена P237. Можливо, це пов'язано з особливостями гена P14, функція якого полягає в пригніченні стійкості цукрових буряків до вірусної інфекції (табл. 3).

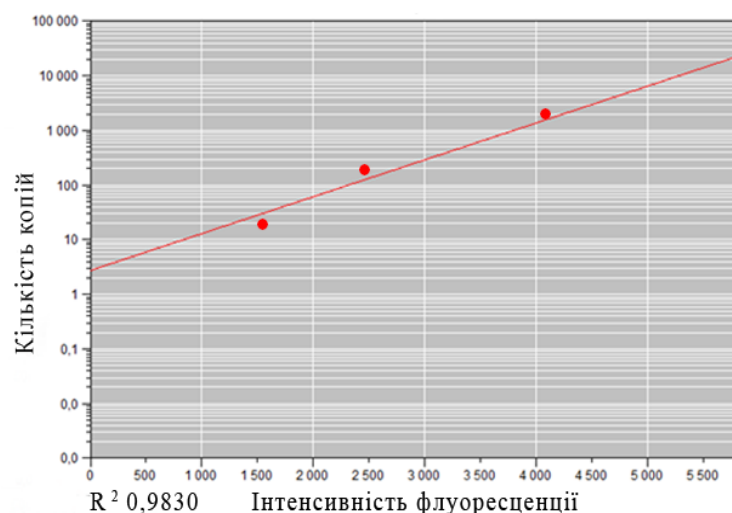


Рис. 15. Калібрувальний графік залежності інтенсивності флуоресценції від логарифму початкової концентрації Р75 ДНК стандартів (R^2 0,9830)

Таблиця 3

Кількісна оцінка фрагментів генома ВПЖБ

Сегмент генома	ВРЗ	Кількість фрагментів генома ВПЖБ $\times 10^2$ в 1 мкл розчину кДНК	Стратегія трансляції	Характеристика
РНК-1	Р237	4,4	геномна	містить хеліказний, метилтрансферазний, протеазний, полімеразний мотиви, відповідає за реплікацію ВПЖБ
РНК-2	Р75	232,8	геномна	білок оболонки (СР)
	Р42	1,2	субгеномна	транслокація ВПЖБ по рослині
	Р13	858,0	субгеномна	
	Р15	725,2	субгеномна	
	Р14	1472,0	субгеномна	трансгенетичний супресор замовчування
РНК-3	Р25	609,4	геномна	формування симптомів ураження
РНК-4	Р31	4,7	геномна	відповідає за передачу ВПЖБ вектором <i>Polymyxa betae</i>

Також у високих концентраціях в уражених рослинах цукрових буряків знаходяться нуклеотидні послідовності генів, що кодують білок оболонки Р75 ($232,8 \times 10^2$ копій в 1 мкл розчину кДНК), та білок Р25 ($609,4 \times 10^2$ копій в 1 мкл розчину кДНК), продукти якого впливають на формування характерних симптомів в уражених рослинах. Таким чином, розроблено систему, що дозволяє проводити кількісне визначення нуклеотидних послідовностей генів ВПЖБ.

ВСТАНОВЛЕННЯ ФІЛОГЕНЕТИЧНОГО ПОЛОЖЕННЯ УКРАЇНСЬКОГО ІЗОЛЯТУ ВНПЖБ

Для проведення філогенетичного аналізу було сиквеновано повнорозмірну нуклеотидну послідовність, що кодує БО – P21 сегмента РНК-2 та фрагмент нуклеотидної послідовності РНК-1 ВНПЖБ. Фрагменти для клонування отримано методом ПЛР із використанням розроблених олігонуклеотидних праймерів: СР-F 5'-cgccgtccagaagaagatag-3', СР-R 5'-caccgagcagcagctaat-3'. Розмір продукту ампліфікації становив 620 п. н. для коректної обробки сиквенсів, оскільки довжина БО ВНПЖБ становить 567 п. н. Для сиквенування фрагмента нуклеотидної послідовності, що кодує ВРЗ протеїну P237 РНК-1 ВНПЖБ, використано пару праймерів для ідентифікації сегмента РНК-1: P237-F 5'-agcggaaatcagtggaaga-3', P237-R 5'-accatcatcgccctcatgg-3'. Послідовності гена БО українського ізоляту ВНПЖБ довжиною 567 п. н. та фрагмент ВРЗ РНК-1, довжиною 803 п. н., що кодує білок P237, занесено до міжнародного генетичного банку даних та присвоєно відповідно номери KR825247.1, KR825246.1 (рис. 16, 17).

¹⁴⁵atgtcgggtgaaggtagatatatgacatggaaggatatgtcacataataagtttatgaccgatcgatgggcccgtgttt
cggacgctcgtgagtgttattaaacaatcgcatgctatggacttgtccaaggctgcaatctatctataaataaaactgcttt
ggcaggattaggctcgggttgactgacaataatccttttggtgccccgatgaccgctttccacagacactaactatgtac
ggtgcacttgtgttatatgtaaatctgtccgaccagaatttgcttgataatgactaaggtaagtactttaactgattcag
ggttagcagataatgcatctgctaatgtgctagagatgtggtgctccggaataaagccgaatcatccggtaaaactgctgg
cactaatgagaattctgcttatacgttaccgcttagtcttgctgggttgctcaagctcttaggcttgaggaaattaatgtgg
actcgggataagtttgaggaccggttgaagttaccatggacacctgttcaaggtagaaccagctccaccggacaatag⁷¹¹

Рис. 16. Нуклеотидна послідовність гена, що кодує БО українського ізоляту ВНПЖБ

⁵¹⁵³agcggaaatcagtggaagaattacaggttcaacaggctcggtaacttatttcgaaaagtgagaaattctccgctcatcgac
acaagatagtggtgcacgatggttgctcagctatgtgttctgattgtttgggtgccaaaacgtagctgatactttttctgct
tccaatttggcgaattatggacaaagctatgcatgacatggtcacaaaaaattatcaaggacaaaatggaagaggagtta
cgcgtaatgctaaattatctgcttttcagttgaaggatattgaaaaaccttgaaggaccagagactgatttggcaaggc
tggtcaagggatattggcatgggtctaaggaggcacatgttaagtttatggttgcttttagagttttaaattgatttgttattg
aagtcgttaaactctaattgtttgtttacgataacacaatgtctgagaccgaatttgggtgaaaaataaatgcccgatgaata
tagtaccggatagtgctataaacggggttatcgatgctgctgcttgcgattctgggcaagggtttttacccaattgataga
aagacatatttatgctgctttgggcatttctgacttctttttggattggtatttctcatttctgagaaatatgttatgcag
tccagatagtcagagcacatatgtcttatgttaagactagtggaagaaccggcactttgcttggttaacaccattttaaagg
gtgctatgttaaattgctatgcttctggtgggaccggaccattttgtatggccatgaaggggcgatgatggt⁵⁹⁵⁵

Рис. 17. Нуклеотидна послідовність гена, що кодує ВРЗ протеїну P237 (РНК-1)

Аналіз нуклеотидних і трансльованих амінокислотних послідовностей БО ВНПЖБ методом максимальної парсимонії (модель Tree bication reconnection) показав, що український ізолят знаходиться в одному кластері з ізолятом Швеції (патотип А) зі значенням бутстрепа 71 і 66 % за нуклеотидними та амінокислотними послідовностями і знаходиться в різних кластерах з ізолятами, які походять із Китаю та Японії та належать в основному до патотипу В (рис. 18). При побудові філогенетичного дерева за нуклеотидними та трансльованими амінокислотними послідовностями фрагменту РНК-1 ВНПЖБ показано, що український ізолят КІ7 виявився найближчим сусідом до іспанського та

шведського ізолятів, які належать до патотипу А та знаходиться в різних кластерах з японськими, китайськими та французькими ізолятами (рис. 19).

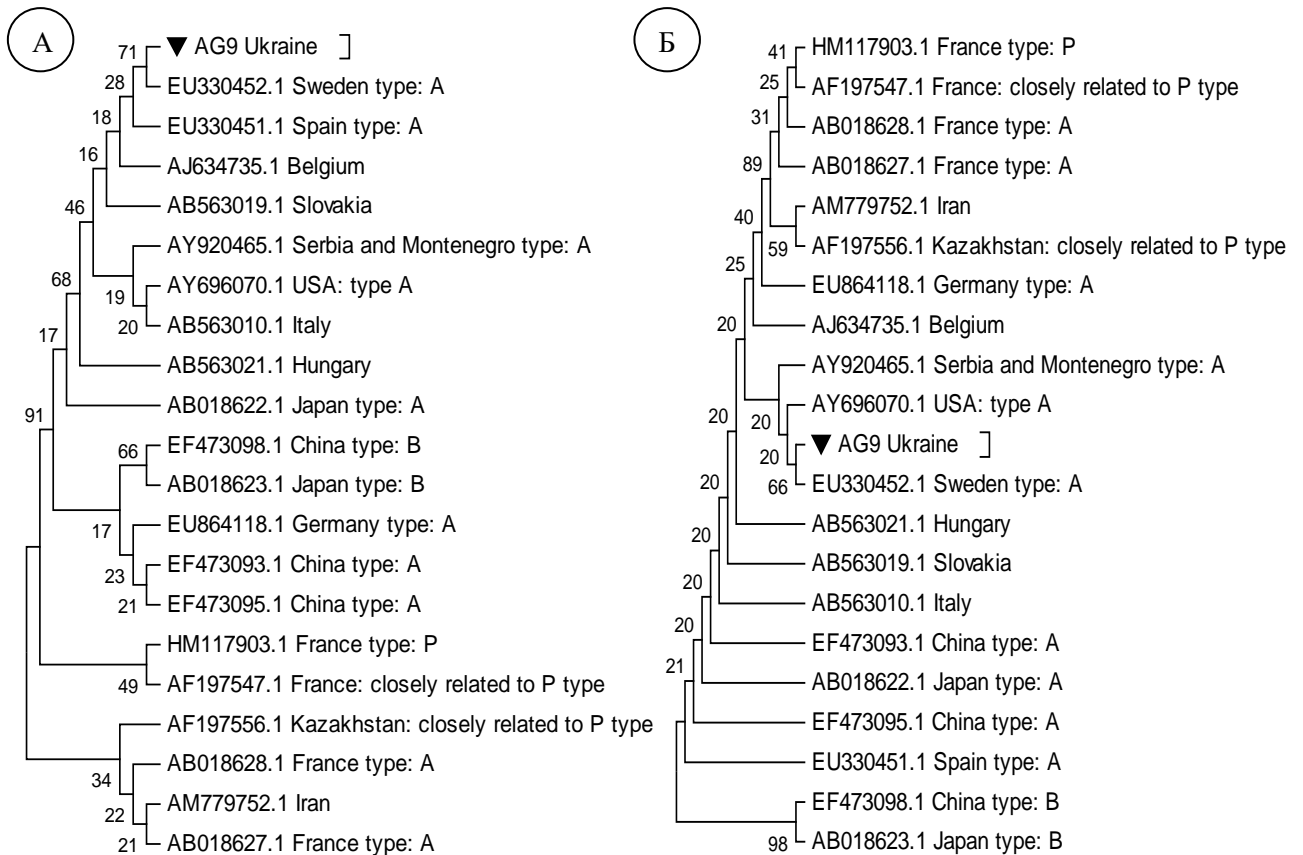


Рис. 18. Філогенетичні дерева: А – за нуклеотидними послідовностями БО ВНПЖБ; Б – за трансльованими амінокислотними послідовностями БО ВНПЖБ; використано метод максимальної парсимонії на основі моделі Tree bicetion rescconnection (цифрами показана достовірність гілкування 1000 альтернативних дерев за допомогою бутстреп-аналізу).

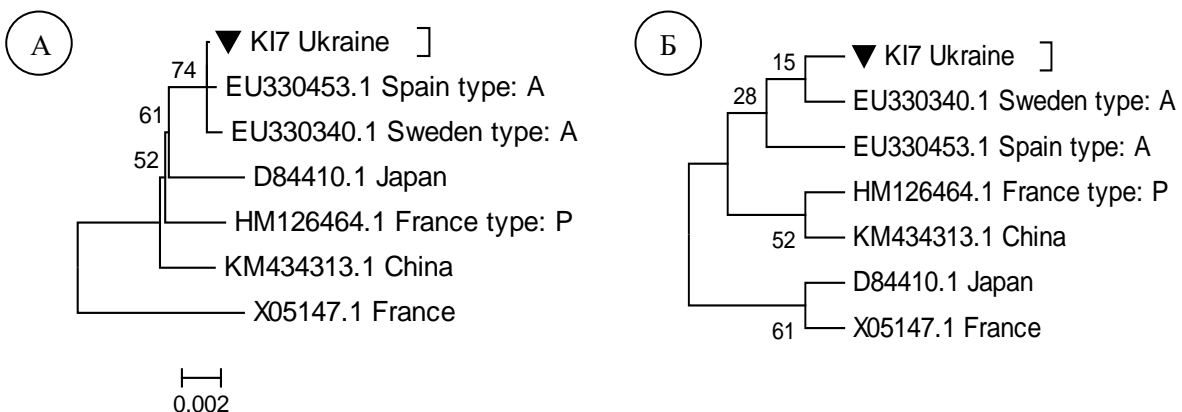


Рис. 19. Філогенетичні дерева: А – за нуклеотидними послідовностями фрагменту РНК-1 ВНПЖБ, на основі методу найближчих сусідів, модель Кімури (масштаб показує еволюційну відстань, яка відповідає 2 замінам на 1000 нуклеотидів); Б – за трансльованими амінокислотними послідовностями фрагменту РНК-1; використано метод максимальної парсимонії на основі моделі Tree bicetion rescconnection (цифрами показана достовірність гілкування 1000 альтернативних дерев за допомогою бутстреп-аналізу).

Отже, при проведенні філогенетичного аналізу показано, що український ізолят ВНПЖБ найбільш подібний до ізолятів Швеції та Іспанії, які належать до патотипу А і відносно віддалений від ізолятів, які походять з Японії, Китаю та Франції.

Отримані дані при пошуку аналогічних послідовностей, які занесено до генетичного банку даних, показали, що серед 152 ізолятів, які мають 100 % покриття гена БО ВНПЖБ, можуть свідчити про належність даних ізолятів до одного штаму. Нижчий відсоток (96 %) гомології відмічено за порівняння ізолята ВНПЖБ AG9 з ізолятами Японії та Китаю, де зустрічається суворий патотип Р, та з ізолятами, які походять з Бельгії та Німеччини. Такий порівняно низький відсоток спорідненості українського ізоляту ВНПЖБ з ізолятами країн Далекого Сходу, може бути пов'язаний із відсутністю прямого обміну насінням цукрового буряку.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, що виявляється в розробленні методів молекулярно-біологічного контролю ВНПЖБ, необхідних для упередження розповсюдження вірусу в Україні.

1. За результатами проведених обстежень агрофітоценозів України з використанням імунологічного методу виявлено ВНПЖБ у зразках цукрових буряків та екстраговано вірусну РНК для розробки системи діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції. Отримано антисироватку до ВНПЖБ з титром 1:6400, яка може бути використана для створення специфічних діагностиків, необхідних для детекції і скринінгу захворювань, обумовлених ВНПЖБ.

2. Розроблено тест-систему для ідентифікації ВНПЖБ за використання полімеразної ланцюгової реакції із праймерами, комплементарними до консервативних послідовностей гена Р21, що кодує білок оболонки вірусу: прямий BNYVV1 5'-ttcggacgtcgtgagtgtta-3' та зворотній BNYVV2 5'-cccgagtcacattaattcc-3' із продуктом ампліфікації 419 п. н.; рекомендована концентрація іонів Магнію в реакційній суміші становить 1,8 мМ, а температура відпалу праймерів знаходиться в межах 54–62 °С.

3. Показано, що за умов інфікування цукрових буряків ВНПЖБ, в клітинах флоєми провідних пучків листків вміст пероксидаз, що зв'язані із клітинними стінками, зменшується на фоні нагромадження вільних ізоферментів у протопластах ситоподібних трубок і клітин-супутниць. Перерозподіл молекул пероксидази в компартментах клітин супроводжується значним підвищенням їх активності. За змішаних інфекцій у паренхімі коренеплодів цукрових буряків також виявлено специфічні середньополярні терпеноїдні сполуки, які є потенційними біохімічними маркерами вірусного патогенезу.

4. Розроблено ПЛР тест-системи для ідентифікації сегментів генома ВНПЖБ: РНК-1 (з використанням праймерів, комплементарних до гена Р237, і одержанням ампліконів розміром 803 п. н.), РНК-2 (Р75, 490 п. н.); РНК-3 (Р25, 424 п. н.); РНК-4 (Р31, 693 п. н.); РНК-5 (Р26, 100 п. н.). Встановлено, що ВНПЖБ, ізольований на території України, містить у складі генома сегменти

РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. Сегмент РНК-5 у геномі українського ізоляту ВВПЖБ відсутній.

5. Створено банк клонованих фрагментів генів ВВПЖБ. Розроблено систему кількісного аналізу сегментів експресії генома ВВПЖБ за використання плазмідних стандартів із клонованими фрагментами вірусних генів. Встановлено, що нуклеотидні послідовності, які кодують ген Р14, функція якого полягає у пригніченні стійкості цукрових буряків до ВВПЖБ, представлені в уражених рослинах у найвищій концентрації.

6. Сиквеновано часткову нуклеотидну послідовність гена Р237 РНК-1 і повнорозмірну нуклеотидну послідовність гена, що кодує білок оболонки (Р21), українського ізоляту ВВПЖБ та депоновано їх у генетичний банк даних під номерами KR825246.1. та KR825247.1.

7. Філогенетичний аналіз білка оболонки та фрагмента гена Р237, який кодує сегмент РНК-1 ВВПЖБ, показав, що український ізолят ВВПЖБ має близьку спорідненість з ізолятами, що належать до патотипу А, і генетично віддалений від ізолятів патотипів В та Р.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для діагностики та ідентифікації ВВПЖБ рекомендується:

– з метою попередження розповсюдження ВВПЖБ використовувати карантинним, фітосанітарним службам розроблені тест-системи на основі полімеразної ланцюгової реакції для контролю насінневого матеріалу на вірусоносійство та в період вегетації для моніторингу ВВПЖБ в агрофітоценозах України;

– використовувати в наукових установах та лабораторіях систему кількісного аналізу ВВПЖБ у рослинному матеріалі для визначення генетичних особливостей РНК сегментів ВВПЖБ та встановлення можливого патотипу;

– використовувати розроблені системи діагностики на основі полімеразної ланцюгової реакції в навчальному процесі вищих учбових закладів на факультетах біологічного та сільськогосподарського напрямів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Гринчук К. В. Вірус некротичного пожовтіння жилок буряку: ПЛР-діагностика та ідентифікація українського ізоляту / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов, М. В. Єрмолаєв // Карантин і захист рослин. – 2015. – № 3. – С. 13–14. *(Здобувачем проведено аналіз для ідентифікації сегментів генома українського ізоляту ВВПЖБ).*

2. Гринчук К. В. Розробка молекулярно-біологічної системи для ідентифікації РНК-4 українського ізоляту вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов // Вісник аграрної науки. – 2015. – № 5. – С. 24–26. *(Здобувачем розроблено систему для ідентифікації сегмента РНК-4 ВВПЖБ та проведено її випробування).*

3. Гринчук К. В. Розробка молекулярно-біологічної системи для ідентифікації РНК-1 українського ізоляту вірусу некротичного пожовтіння жилок

буряку / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов // Біоресурси і природокористування. – 2015. – Т. 7. – № 1–2. – С. 12–18. *(Здобувачем розроблено систему для ідентифікації сегмента РНК-1 ВНПЖБ, проведено оптимізацію роботи системи за основними показниками).*

**Статті у наукових фахових виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних:**

4. Hrynchuk K. The development of the PCR test system for identification of RNA-2 of BNYVV for environmental assessment of phytosanitary state / К. Hrynchuk // *Агроекологічний журнал*. – 2015. – № 2. – С. 128–131.

5. Гринчук К. В. ПЛР ідентифікація РНК-3 українського ізоляту вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку: [електронний ресурс] / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – Режим доступу до журналу: http://nd.nubip.edu.ua/2014_7/8.pdf. *(Здобувачем розроблено систему для ідентифікації сегмента РНК-3 ВНПЖБ, проведено оптимізацію роботи системи за основними показниками).*

Статті у інших виданнях:

6. Антіпов І. О. Розробка ПЛР тест-систем для діагностики та ідентифікації вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку / І. О. Антіпов, **К. В. Гринчук**, М. В. Єрмолаєв // Наукові праці Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків. – 2013. – № 17. – С. 341–344. *(Здобувачем розроблено систему на основі полімеразної ланцюгової реакції для ідентифікації ВНПЖБ та проведено підбір умов для її коректної роботи).*

7. Гринчук К. В. Розробка системи ідентифікації вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку та його моніторинг на території України / **К. В. Гринчук**, О. І. Антіпов, М. В. Єрмолаєв // Науковий вісник Чернівецького національного університету. Біологія (Біологічні системи). – 2015. – Т. 7. – № 1. – С. 28–34. *(Здобувачем проведено скринінг зразків цукрового буряку на наявність ВНПЖБ та оптимізацію роботи системи на основі полімеразної ланцюгової реакції).*

Тези наукових доповідей:

8. Гринчук К. В. Біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей геному вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку та розробка діагностичних тест-систем / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов, М. В. Єрмолаєв // Актуальні проблеми наук про життя та природокористування: II Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, м. Київ, 16–18 жовтня 2013 р.: тези доповіді. – Київ, 2013. – С. 11–12. *(Здобувачем проведено біоінформативний аналіз нуклеотидних послідовностей генома ВНПЖБ та розроблено систему ідентифікації ВНПЖБ).*

9. Гринчук К. В. Методи ідентифікації вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов // Dnyvedy: X Sberne nadobeobsahují materially mezinarodni vedeco-prakticka konference posekcich Biologicke vedy,

м. Прага, 27 березня 2014 р. – Прага, 2014. – С. 37–38. *(Здобувачем проведено аналіз літературних джерел щодо існуючих методів ідентифікації ВНПЖБ).*

10. Гринчук К. В. Розробка систем ПЛР аналізу геному вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов // Fundamental and applied science – 2014: X International scientific and practical conference, Шеффілд; 30 жовтня – 7 листопада 2014 р. – Велика Британія, 2014. – № 14. – С. 59–61. *(Здобувачем проведено ідентифікацію сегментів РНК генома українського ізоляту ВНПЖБ).*

Методичні рекомендації:

11. Гринчук К. В. Молекулярна діагностика та ідентифікація вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку (ВНПЖБ): [методичні рекомендації] / **К. В. Гринчук**, І. О. Антіпов. – Київ, 2015. – 24 с.

АНОТАЦІЯ

Гринчук К. В. Молекулярна діагностика та ідентифікація вірусу некротичного пожовтіння жилок буряку. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 06.01.11 – фітопатологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2016.

Проведено моніторинг території України для пошуку вірусу некротичного пожовтіння жилок (ВНПЖБ), який було використано в якості позитивного контролю для розробки системи діагностики та ідентифікації ВНПЖБ на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Встановлено присутність білкових компонентів у зразках цукрових буряків методом імуноферментного аналізу. За використання біотесту та електронної мікроскопії підтверджено наявність ВНПЖБ. Отримано поліклональні антитіла до ВНПЖБ.

Розроблено тест-систему на основі полімеразної ланцюгової реакції для діагностики та ідентифікації ВНПЖБ із праймерами, комплементарними до консервативних послідовностей гена, що кодує білок оболонки вірусу та підібрано оптимальні умови проведення ПЛР. Розроблено ПЛР тест-систему для ідентифікації сегментів генома ВНПЖБ і створено плазмідні стандарти для кількісного аналізу елементів експресії генома ВНПЖБ. З'ясовано генетичні особливості українського ізоляту ВНПЖБ. Сиквеновано повнорозмірну нуклеотидну послідовність гена білка оболонки і часткову нуклеотидну послідовність РНК-1 українського ізоляту ВНПЖБ та занесено сиквенс українського ізоляту ВНПЖБ у генетичний банк даних.

Ключові слова: ВНПЖБ, діагностика, ідентифікація, вірус, ген, білок, ПЛР, РНК.

АННОТАЦИЯ

Гринчук Е. В. Молекулярная диагностика и идентификация вируса некротического пожелтения жилок свеклы. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.11 – фитопатология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2016.

Проведён мониторинг территории Украины для поиска ВМПЖС, который был использован в качестве позитивного контроля для разработки систем диагностики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Подтверждено наличие ВМПЖС в образцах сахарной свёклы, которые были отобраны в Чемеровецком районе Хмельницкой области, методом иммуноферментного анализа при использовании коммерческих систем диагностики. Инокулированы растения-индикаторы гомогенатом листовых пластин образца сахарной свеклы, в котором идентифицирован ВМПЖС. Симптомы инфицирования отмечали на 13–21 сутки после проведения инокуляции. На растениях *B. vulgaris* var. *saccharifera* L. проявлялась мозаика, на *G. globosa* L., *C. murale* L., *D. metel* L., *T. expansa* L. появлялись некрозы, что характерно для ВМПЖС. Для очистки ВМПЖС были использованы растения-индикаторы *B. vulgaris* var. *saccharifera*, которые проявили системную реакцию на инфицирование вирусом. Получено очищенный препарат ВМПЖС в концентрации 5 мг/мл. Подтверждено методом электронной микроскопии наличие вирионов ВМПЖС в очищенном препарате диаметром 20 нм и длиной около 390 нм. Также получена поликлональная сыворотка, которая содержала специфические к ВМПЖС антитела в титре 1:6400. Разработана тест-система на основе ПЦР для диагностики и идентификации ВМПЖС с праймерами, комплементарными к консервативным последовательностям гена Р21, который кодирует белок оболочки вируса и подобраны оптимальные условия проведения ПЦР. Установлено, что под действием патогенов в накопительных тканях корнеплодов сахарной свеклы появлялись специфические среднеполярные соединения класса терпеноидов и тритерпеновых гликозидов, что может служить потенциальными маркерами патогенных процессов.

Для проведения исследований особенностей генома ВМПЖС, изолированного на территории Украины, разработано диагностические тест-системы на основе ПЦР для идентификации сегментов генома ВМПЖС, а именно праймера для идентификации протеина Р237 на РНК-1; Р75, Р42, Р13, Р15, Р14 на РНК-2, Р25 на РНК-3, Р31 на РНК-4, Р26 на РНК-5 со следующими нуклеотидными последовательностями: прямой Р237-F 5'-agcggaatcagtggaaga-3', обратный Р237-R 5'-accatcatcgcccttcatgg-3' с размером продукта амплификации 803 п. н.; прямой Р75-F 5'-ctttggcaggattaggctcg-3', обратный Р75-R 5'-sactcgggactatcaccagg-3' – 490 п. н.; прямой Р42-F 5'-aaaccggacattgcgattg-3', обратный Р42-R 5'-accagaaaagtgtccaaccg-3' – 326 п. н.; прямой Р13-F 5'-tgtattgctggcgttcatgc-3', обратный Р13-R 5'-tcgactactaacgctacccc-3' – 175 п. н.; прямой Р14-F 5'-gggatctgaaagtgtgaggg-3', обратный Р14-R 5'-асаатсассгсааасастааа-3' – 274 п. н.; прямой Р25-F 5'-tgtgggttcgtgccttatg-3',

обратный P25-R 5'-cgtcaggggcttgaataacatt-3' – 424 п. н.; прямой P31-F 5'-gctaggatggtgcagaaacg-3', обратный P31-R 5'-atcasaacccctcgccacc-3' – 474 п. н.; прямой P26-F 5'-atatgtggcttggttgtagt-3', обратный P26-R 5'-cacaggtcgttgccaaaatct-3' – 100 п. н. Проведена идентификация сегментов генома ВНПЖБ и установлено наличие РНК-1, РНК-2, РНК-3, РНК-4. Сегмент РНК-5 в геноме украинского изолята ВНПЖС выявлен не был.

Созданы плазмидные стандарты для определения количественного накопления вирусного генома в растительном материале. Показано, что нуклеотидные последовательности, которые кодируют ген Р14 ВНПЖС, представлены в инфицированных растениях в самой высокой концентрации, а именно $1,472 \times 10^5$ в 1 мкл раствора экстрагированной РНК.

Последовательности гена БО украинского изолята ВНПЖС длиной 567 п. н. и фрагмент белка Р237, который кодирует открытую рамку считывания РНК-1, длиной 803 п. н., занесены в международный банк данных со следующими номерами: KR825247.1, KR825246.1.

По результатам проведенного филогенетического анализа нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей установлено, что украинский изолят ВНПЖС более близкий к изоляту Швеции, который принадлежит к патотипу А и находится в разных кластерах с изолятами Японии, Китая, Франции.

Ключевые слова: ВНПЖС, диагностика, идентификация, вирус, ген, белок, ПЦР, РНК.

ANNOTATION

Grynychuk K. V. Molecular diagnostic and identification of beet necrotic yellow vein virus. – The manuscript.

Thesis for the scientific degree of candidate of science in biology, specialty 06.01.11 – Phytopathology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

The monitoring of Ukrainian agrocoenosis has been made for Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) searching, which was used as a positive control for the development of diagnostics based on polymerase chain reaction (PCR). ELISA method has established the presence of protein in the samples of sugar beet. Using bioassays and electron microscopy has confirmed the presence of BNYVV. Polyclonal antibodies for BNYVV identification have been obtained.

A test-system has been developed based on polymerase chain reaction for diagnosis and identification of BNYVV with complementary primers to the conserved sequences of gene that encoding the virus coat protein. Also the optimum conditions for PCR have been established. PCR test-systems for segments identification of BNYVV have been developed and plasmid standards for the quantitative analysis of genome expression elements have been created. The genetic features of Ukrainian isolate of BNYVV have been established. The full-size nucleotide sequence of coat protein and partial nucleotide sequence of RNA-1 have been established and deposited into a genetic database.

Key words: BNYVV, diagnostic, identification, virus, gene, protein, PCR, RNA.