

Рослинництво, кормовиробництво

УДК 632.38 575.86
634.13
© 2014

К.М. Удовиченко,
кандидат
біологічних наук
Інститут
садівництва НААН

МОЛЕКУЛЯРНО-ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ ХЛОРОТИЧНОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ЛИСТЯ ЯБЛУНІ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ГРУШІ

Здійснено ЗТ-ПЛР-діагностику зразків груші на наявність вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні, виділено українські ізоляти та отримано сиквенси фрагментів гена капсидного білка. Проведено філогенетичний аналіз та встановлено рівні ідентичності їх нуклеотидних та амінокислотних послідовностей з відомими ізолятами.

Ключові слова: філогенетика, віруси, груша, ізоляти, ПЛР.

Вірусні хвороби негативно впливають на продуктивність насаджень плодкових культур. Зокрема, для культури груші одним із шкочинних патогенів є вірус хлоротичної плямистості листя яблуні (ВХПЛЯ, *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*, ACLSV) [4]. На чутливому сорті Бере Гарді він призводить до значних порушень: довжина пагонів і листкова пластинка зменшуються на 20%, товщина стовбура — на 10, урожайність зменшується на 15%, знижується морозостійкість [1]. Нині ВХПЛЯ виявлено в багатьох країнах, де культивують грушу. Вірус передається із соком рослини під час механічних ушкоджень, щепленням, через контакт коренів рослини між собою методом інокуляції. Векторів-переносників на сьогодні не виявлено.

Основним методом запобігання поширенню ВХПЛЯ є використання безвірусного садивного матеріалу, а одним із найчутливіших методів діагностики цього вірусу є полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР).

Вірус хлоротичної плямистості листя яблуні належить до роду *Trichovirus* родини *Flexiviridae* [2], має гнучкі ниткоподібні віріони довжиною 600–760 і 12 нм у діаметрі [9]. Геном складається з однієї лінійної смислової одноланцюгової молекули РНК довжиною 7545–7555 н.о. без урахування полі-А кінця і містить 3 відкриті

рамки зчитування, які частково перекриваються. Нині у світі отримано повні та часткові нуклеотидні сиквенси геному ізолятів ВХПЛЯ, виділених з яблуні, груші, сливи, персика та черешні. В Україні такі дослідження було здійснено лише з ізолятами ВХПЛЯ, виділеними з яблуні [5].

Мета досліджень — перевірка дослідних зразків груші на наявність ВХПЛЯ, виділення українських грушевих ізолятів вірусу, сиквенування фрагментів їх геному та проведення порівняльного і філогенетичного аналізу з уже відомими ізолятами ВХПЛЯ.

Матеріали і методи досліджень. Зразки груші для тестування відбирали в плодоносних насадженнях Інституту садівництва НААН. Перевірено зразки: 1. Золотоворітська 10–22; 2. Вижниця 5–1; 3. Конкорд 5–13; 4. Кримські зорі 1–58; 5. Гібрид 4–34; 6. Вижниця 5–114; 7. Улюблена Клапа 1–59; 8. Юта 1–16; 9. Гранд Чемпіон 1–51; 10. Сонатина 12–22; 11. Сонатина 12–20; 12. Етюд 11–24; 13. Юта 1–14; 14. Гібрид Рх-12-47 5–36; 15. Смерічка 12–60.

Екстракцію РНК зі зразків груші виконували за допомогою наборів «RNeasy Plant Mini Kit» виробництва «Qiagen» та «DNA Purification kit» виробництва «Fermentas» згідно з рекомендаціями виробника. Для виявлення ВХПЛЯ використовували пару праймерів до фрагмента



Рис. 1. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР на наявність ВХПЛЯ: М — маркер молекулярних мас Invitrogen 100 bp; 1–15 — зразки

гена капсидного білка вірусу ACLSV-s та ACLSV-as, для перевірки зворотної транскрипції — праймери до внутрішнього контролю *nad5-s* та *nad5-as* [6]. ЗТ-ПЛР виконували за допомогою «Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR». Реакції здійснювали відповідно до рекомендацій виробника з модифікаціями. Склад реакційної суміші (1 реакція — 1 патоген): 2xПЛР мікс 10 мкл; RT/Platinum Taq Mix 0,4 мкл; MgSO₄ (50 мкМ) 0,6 мкл; «Ribolock» 0,5 мкл; Твін-20 5% 0,4 мкл; ASPV-s (10 мкМ) 2 мкл; ASPV-as (10мкМ) 2 мкл; *nad5-s* + *as*

(10 мкМ) 0,2+0,2 мкл; РНК 2 мкл; Н₂О вільна від РНКаз 1,7 мкл. Параметри реакції були такими: за температури 50°C — 30 хв; 95°C — 5 хв; 40 циклів: за температури 94°C — 30 с, 55°C — 40 с, 72°C — 1 хв; 72°C — 10 хв. Результати реакції реєстрували за допомогою електрофорезу у 2%-му агарозному гелі з використанням маркерів 100 bp O'Gene Ruller DNA Ladder Invitrogen.

Пошук гомологічних послідовностей здійснювали з використанням програми BLAST у базі даних Генбанку. За допомогою програми MEGA 5 виконували множинне вирівнювання та побудову філогенетичних дерев методом зв'язування найближчих сусідів (neighbor joining, NJ) [6].

Результати досліджень. За проведення діагностики зразків груші на наявність ВХПЛЯ очікуваний продукт ампліфікації має бути довжиною 677 пн. Згідно з результатами ЗТ-ПЛР інфікованими виявилися зразки таких сортів: 2. Вижниця 5–1; 3. Конкорд 5–13; 4. Крим-

Відсоток ідентичності фрагмента гена капсидного білка українських ізолятів ВХПЛЯ з ізолятами з Генбанку

№ доступу в Генбанку	Хазяїн	Країна походження	Ідентичність послідовностей, %			
			ACLSV-43		ACLSV-49	
			нт	ак	нт	ак
AJ586624	Яблуня	Албанія	94	97	88	98
GQ334204	Груша	Канада	94	99	88	99
GQ334190	Яблуня	Канада	94	99	88	99
AV326224	Яблуня	Японія	94	98	86	98
AJ586641	Яблуня	Туреччина	93	98	86	98
AM882704	Груша	Індія	87	97	84	98
GU328004	Груша	Китай	85	94	88	96
GQ325609	Груша	Китай	87	96	85	97
AF251275	Слива	Польща	86	93	87	95
AJ586632	Абрикос	Іспанія	89	94	84	96
DQ834688	Яблуня	Ізраїль	92	97	88	98
AJ586628	Мигдаль	Італія	90	93	85	94
FN391009	Груша	Греція	91	98	85	99
DQ329161	Персик	Болгарія	92	98	88	99
GQ334210	Груша	Китай	93	98	86	98
AJ586625	Яблуня	Албанія	93	98	88	99
AM498046	Мигдаль	Індія	93	98	87	99
AM494510	Яблуня	Індія	93	98	87	99
FN666578	<i>P. cerasoides</i>	Індія	93	98	87	99
FN386786	Яблуня	Греція	93	98	86	99
GQ334187	Яблуня	Канада	91	99	93	99
GQ334202	Груша	Канада	87	98	86	99
GQ334185	Яблуня	Канада	91	98	92	99
AM709776	Яблуня	Індія	87	98	83	99

Примітка. нт — ідентичність нуклеотидної послідовності, %; ак — ідентичність амінокислотної послідовності, %.

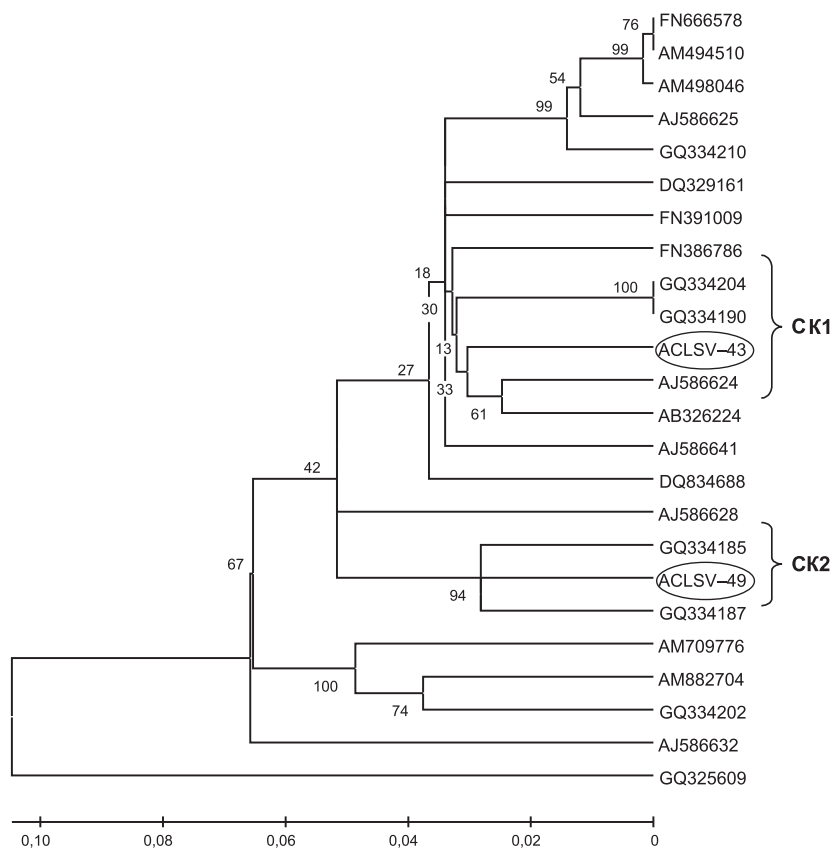


Рис. 2. Філогенетичне дерево, побудоване з використанням послідовностей фрагмента гена капсидного білка ізолятів ВХПЛЯ методом NJ; SK1, SK2 — субкластери

ські зорі 1–58; 8. Юта 1–16 та 15. Смерічка 12–60 (рис. 1).

Ампліфіковані фрагменти гена капсидного білка ВХПЛЯ, отримані за результатами ЗТ-ПЛР, було просиквеновано для виконання філогенетичного аналізу українських ізолятів вірусів груші з уже відомими.

Філогенетичний аналіз потрібний для вивчення різноманіття, походження та поширення вірусів рослин. Він дає змогу спостерігати ключові зміни, що підсилюють здатність патогенів поширюватися та вражати окремих хазяїв, є необхідним для визначення походження патогену та напрямів його еволюції. Крім того, аналіз спорідненості нуклеотидних послідовностей різних ізолятів вірусу дає можливість оптимізувати методику його діагностики.

Нуклеотидна послідовність гена та амінокислотна послідовність капсидного білка вірусів роду *Trichovirus* характеризуються середнім рівнем варіабельності. Мінімальний рівень

внутрішньовидової ідентичності нуклеотидної послідовності гена капсидного білка представників роду *Trichovirus* становить 80,8%, а ідентичність амінокислотних послідовностей — 87,1% [2].

Сиквенування нуклеотидних послідовностей фрагмента гена капсидного білка ВХПЛЯ було здійснено для 2-х ампліконів: ACLSV-43 — ізолят, виділений зі зразка сорту Конкорд 5–13 та ACLSV-49 — ізолят зі зразка сорту Смерічка 12–60. Інформацію про нуклеотидні послідовності цих ізолятів було внесено до бази даних Генбанку (www.ncbi.nlm.gov) та присвоєно номери: ACLSV-43 — JQ866622 та ACLSV-49 — JQ866623.

Рівень ідентичності просиквенованих нуклеотидних послідовностей ВХПЛЯ становив лише 87%, що свідчить про різне їх походження.

Пошук гомологічних послідовностей за допомогою родини програм BLAST виявив, що амплікон ACLSV-43 на 94% ідентичний ізоляту

M54, виділеному з яблуні в Албанії (AJ586624). Також 94% подібності спостерігали з ізолятами з Канади (GQ334204, GQ334190) та Японії (AB326224). З ампліконом ACLSV-49 найвищий відсоток подібності мали яблуневі ізоляти з Канади: Malus063 (GQ334187) і Malus097 (GQ334185) — 93 та 92% відповідно.

Для вирівнювання послідовностей та побудови філогенетичного дерева в базі даних Генбанку було відібрано гомологічні послідовності 24-х ізолятів ВХПЛЯ, що походять із різних країн світу та виділені з широкого кола господарів (груші, яблуні, сливи, абрикоса, персика та мигдалю) (таблиця).

На побудованій філограмі (рис. 2) українські ізоляти ВХПЛЯ увійшли в різні кластери. Ізолят ACLSV-43 увійшов у субкластер 1 разом з ізолятами з Албанії та Японії, що характеризувалися найвищим рівнем ідентичності — 94%.

Також у цей кластер увійшли грушевий (GQ334204) та яблуневий (GQ334190) ізоляти з Канади та ізолят з Туреччини (AJ586641, яблуня). Ізолят ACLSV-49 утворив невеликий субкластер з 2-ма яблуневими ізолятами, що походять із Канади.

Отже, філогенетичний аналіз не виявив чіткого розподілу українських та відомих ізолятів ВХПЛЯ за певною ознакою — країна походження чи рослина-хазяїн.

Відомі ізоляти ВХПЛЯ, виділені з груші, не утворили окремого кластера, а розподілилися між окремими гілками філогенетичного дерева. Так, ізолят із Греції (FN391009, груша) виявився найбільш спорідненим з ізолятом із Болгарії (FN391009, персик), ізолят з Індії (AM882704, груша) — з ізолятом із Канади (GQ334202, груша).

Під час аналізу амінокислотних послідовностей досліджуваних ізолятів ВХПЛЯ виявлено, що ACLSV-43 та ACLSV-49 на 98% ідентичні з ізолятом В6 (Японія), який належить до групи ізолятів ВХПЛЯ і характеризується консервативною амінокислотою комбінацією капсидного білка Ser40-Leu59-Tyr75-Thr130-Leu184. Дві амінокислоти, серин та тирозин, у позиціях 40 та 75 відповідно відіграють ключову роль в інфекційності вірусу, впливають на накопичення в інфікованих тканинах вірусної геномної РНК, дволанцюгової РНК та капсидного і транспортного білків [8].

Висновки

Виділені з груші ізоляти ВХПЛЯ продемонстрували досить низьку ідентичність за порівняння між собою — 87%, виявилися більш спорідненими з відомими послідовностями

цього вірусу, внесеними до Генбанку, що може пояснюватися різними джерелами їх походження та свідчити про циркуляцію в насадженнях груші в Україні 2-х штамів цього вірусу.

Бібліографія

1. Вердеревская Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда/Т.Д. Вердеревская, В.Г. Маринеску. — Кишинев: Штиинца, 1985. — С. 236–285.
2. Adams M.J. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation/M.J. Adams, J.F. Antoniw, M. Bar-Joseph [et al.]//Arch Virol. — 2004. — V. 149. — P. 1045–1060.
3. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV)/S. German-Retana, R.P. Delbos, T. Candresse [et al.]//Archives of Virology. — 1997. — V. 142. — P. 833–841.
4. EPPO certification schemes for pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. — EPPO, 2001. — 15 p.
5. Genetic diversity of Flexiviruses infecting pome fruit trees/S. Gadiou, J.K. Kundu, S. Paunovic [et al.]//J. Plant Pathol. — 2010. — V. 92 (3). — P. 685–691.
6. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods/K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson [et al.]//Molecular Biology and Evolution. — 2011. — doi:10.1093/molbev/msr121
7. Menzel W. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control/W. Menzel, W. Jelkmann, E. Maiss//J. of Virological Methods. — 2002. — V. 99 — P. 81–92.
8. The combinations of the two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity/H. Yaegashi, M. Isogai, H. Tajima [et al.]//J. Gen. Virol. — 2007b. — V. 88. — P. 2611–2618.
9. Yoshikawa N. Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot virus/N. Yoshikawa, T. Takahashi//J. Gen. Virol. — 1988. — V. 69. — P. 241–245.

Надійшла 25.10.2012.