

ДЕТЕКЦІЯ ТА ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСУ ЯМКУВАТОСТІ
ДЕРЕВИНИ ЯБЛУНІ, ВИДІЛЕНОГО З ГРУШІ

К.М. УДОВИЧЕНКО, молодший науковий співробітник

В.М. УДОВИЧЕНКО, зав. відділом

Інституту садівництва НААН

І.Г. БУДЗАНІВСЬКА, кандидат біологічних наук

В.П. ПОЛІЩУК, доктор біологічних наук

Київський національний університет ім. Т.Шевченка

Проведено ЗТ-ПЛР діагностику зразків груші на наявність вірусу ямкуватості деревини яблуні, виділено українські ізоляти та отримано сиквенс фрагменти гена капсидного білка. Проведено філогенетичний аналіз та встановлено рівні гомології їх нуклеотидних та амінокислотних послідовностей з відомими ізолятами.

Ключові слова: *вірус ямкуватості деревини яблуні, груша, ЗТ-ПЛР, філогенетика*

Вірус ямкуватості деревини яблуні (ВЯДЯ) є поширений у всьому світі, типовим представником роду *Foveavirus* родини *Flexiviridae* [9]. Він здатний інфікувати представників родини *Rosaceae*, зокрема, яблуню, грушу та айву. На деревах комерційних сортів груші ВЯДЯ перебуває переважно в латентному стані, але може призводити до зниження сили росту і врожайності (від 15 до 40 %) залежно від їх чутливості [1]. Цей вірус передається щепленням, через контакт коренів та методом інокуляції.

Основним методом запобігання поширенню ВЯДЯ є використання безвірусного садивного матеріалу, а одним з найчутливіших методів тестування – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Відомо, що різні ізоляти ВЯДЯ, виділені зі зразків яблуні, характеризуються високим рівнем варіабельності геному [3], що може ускладнювати діагностику при неправильному підборі праймерів.

Тому метою нашої роботи була перевірка дослідних зразків груші на наявність вірусу ямкуватості деревини яблуні, виділених українських ізолятів,

сиквенування фрагментів їх геному зі зразків груші та проведення філогенетичного аналізу із вже відомими ізолятами.

Матеріали та методи дослідження. Зразки груші для тестування відбирали у плодоносних насадженнях груші Інституту садівництва НААН. Переверено 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 проводили за допомогою комерційного набору DNA Purification kit Fermentas згідно з рекомендаціями виробника. Для виявлення ВЯДЯ використовували пару праймерів до фрагмента гена капсидного білка вірусу, підібрані Menzel, 2002 [5], для перевірки проходження зворотної транскрипції – внутрішній контроль *nad5* (табл. 1), а для проведення ЗТ-ПЛР – комерційний набір Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR. Постановку реакції здійснювали відповідно до рекомендацій виробника. У реакційну суміш додавали інгібітор рибонуклеаз «Ribolock» Fermentas та Твін-20.

1. Нуклеотидні послідовності праймерів для проведення ЗТ-ПЛР

Праймер	Нуклеотидна послідовність у 5'-3' напрямку	Розмір продукту
ASPV		370 п.н.
Sense	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	
Antisense	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	
<i>nad5</i>		181 п.н.
Sense	GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT	
Antisense	CTCCAGTCACCAACATTTGGCATAA	

Склад реакційної суміші (одна реакція – один 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.

ЗТ-ПЛР проводили в ампліфікаторі виробництва фірми «Eppendorf». Параметри реакції були такими: при температурі 50°C – 30 хв; 95°C – 5 хв; 40 циклів: при температурі 94°C – 30 с, 55°C – 40 с, 72°C – 1 хв; 72°C – 10 хв.

Результати реакції реєстрували за допомогою електрофорезу у 2 %-вому агарозному гелі з використанням маркерів 100 bp O`Gene Ruller DNA Ladder Invitrogen.

Пошук гомологічних послідовностей проводили за допомогою програми BLAST у базі даних Генбанку, множинне вирівнювання – у програмі CLUSTAL W [10]. Побудову філогенетичних дерев здійснювали методом зв'язування найближчих сусідів (neighbor joining, NJ) за допомогою програми MEGA 4.

Результати досліджень та їх обговорення. ЗТ-ПЛР на наявність вірусу ямкуватості деревини яблуні виявила присутність вірусу у 6 з 15 перевірених зразків: Кримські зорі 1-58, гібрид 4-34, Улюблена Клапа 1-59, Гранд Чемпіон 1-51, гібрид Рх-12-47, про що свідчила наявність фрагмента ампліфікації довжиною 370 п.н. (рис. 1).

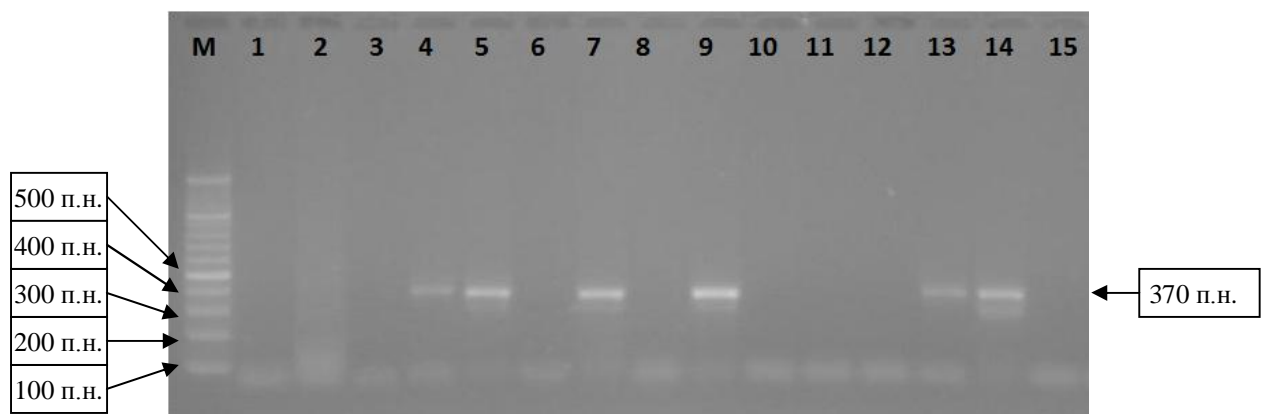


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР на наявність ВЯДЯ.

М – маркер молекулярних мас Invitrogen 100bp; 1 – 15 – номери зразків.

Для сиквенування відібрали два амплікони фрагментів геному вірусу ямкуватості деревини яблуні: ASPV-39 – ізолят, виділений з сорту Гранд Чемпіон ряд 1, дерево 51 та ASPV-42 – ізолят з сорту Улюблена Клапа р.1, д. 59 (табл. 2).

За допомогою програми BLAST виявили рівень гомології між фрагментами геному обох названих ізолятів, виділених з інфікованих зразків груші, який становив 89 %, що свідчить про досить високу варіабельність геному українських ізолятів вірусу.

2. Нуклеотидні послідовності фрагментів гена капсидного білка українських ізолятів вірусу ASPV, виділених зі зразків груші

ASPV-39

1	TTTATGTCTG	GAACSTCATG	CTGCAAACCTC	AAAGTCCACC	40
41	TGCCAACTGG	GTTGGTAAGG	AATTCAAATT	TGAGACCAGG	80
81	TATGCAGCTT	TTGATTTTTT	TTTTGGGGTC	GAAAGCACTG	120
121	CATCCCTTGA	ACCAGCTGAT	GGCCTGATAA	GGCTGCCAAC	160
161	CCAGGCTGAG	AGGGTGGCCA	ATGCTACAAG	CAAAGAGATA	200
201	CAGATGTATC	GAATCCGCTC	TATGGAGGGT	ACCCAGGCTG	240
241	TAAATTTTGG	TGAGGTCACA	GGGGGAAAAG	TTGGACCCAA	280
281	GCCAGTTCTA	TCCATTAGGA	A		301

ASPV-42

1	TTTATGTCTG	GAACSTCATG	CTGCAAACCTC	AAAGTCCTCC	40
41	TGCCAATTGG	GTTGGTAAAG	AATTTAAATT	CGAGACAAGG	80
81	TATGCAGCTT	TTGACTTCTT	CTTTGGGGTC	GAAAGCACTG	120
121	CATCCCTTGA	GCCAGCTGAC	GGCСТААТАА	GGCTTCCAAC	160
161	CCAGGCCGAG	AGAGTAGCCA	ATGCCACTAG	CAAAGAGATA	200
201	CAGATGTTCC	GCATCCGCTC	TATGGAGGGT	ACCCAGGCTG	240
241	TGAACTTTGG	TGAGGTTACA	GGGGGAAAAA	TTGGACCCAA	280
281	GCCTGTTTTA	TCCATTAGGA	A		301

Подальший пошук гомологічних послідовностей у базі даних Генбанку (www.ncbi.nlm.gov) показав, що амплікон ASPV-39 характеризувався найвищим рівнем ідентичності нуклеотидної послідовності з ізолятами ВЯДЯ з Китаю (коди доступу NM125159 та EU708018) і Чехії (AJ968944). Найнижчі рівні гомології були з ізолятами вірусу зірчастої плямистості персика (AF318061, Франція) і латентного вірусу абрикоса (HQ339956, Італія) відповідно 77 і 76 %.

3. Відсоток гомології фрагмента гена капсидного білка українських ізолятів з ізолятами з Генбанку

Код доступу ізолята в Генбанку	Хазяїн	Походження	Гомологія послідовностей, %			
			ASPV-39		ASPV-42	
			Нт	Ак	Нт	Ак
AF345895	Груша	Польща	87	95	96	98
D21828	Груша	Німеччина	87	96	91	97
D21829	Яблуня	Німеччина	87	96	91	97
HM125159	Яблуня	Китай	89	96	91	97
EU708018	Груша	Китай	88	96	88	96
HM352767	Груша	Тайвань	87	96	91	97
AJ968944	Яблуня	Чехія	88	96	91	97
AF345893	Груша	Польща	88	96	91	97
AF491929	Груша	Польща	87	96	89	97
AU572458	Яблуня	Бразилія	83	92	87	94
FM212637	Яблуня	Індія	85	96	86	98
FN430678	Груша	Індія	83	95	85	98
FJ970951	Яблуня	Україна	83	95	87	96
FJ970950	Яблуня	Україна	85	95	87	96
AF345894	Груша	Польща	87	94	88	95
AF438521	Яблуня	Польща	86	96	88	97
DQ003336	Яблуня	Чехія	84	96	84	97
FR750244	Яблуня	Індія	83	96	86	98
FJ970953	Яблуня	Бельгія	85	96	86	97
FJ970961	Яблуня	Туреччина	85	95	84	96
HQ339956	Абрикос	Італія	76	90	77	91

Нт – відсоток гомології нуклеотидної послідовності; Ак – відсоток гомології амінокислотної послідовності.

Нуклеотидна послідовність амплікона ASPV-42 була подібною до ізоляту вірусу ямкуватості деревини яблуні з Польщі (AF345895) на 96 %, з ізолятами ВЯДЯ з Китаю (HM125159) та вірусу пожовтіння жилок груші з Німеччини

(D21828) 91 %. Найнижчу ідентичність виявили з ізолятами латентного вірусу абрикоса (HQ339956, Італія) та вірусу димчастої кільцевої плямистості персика (AF318062, Італія) – 78 %.

Для проведення філогенетичного аналізу одержаних нами нуклеотидних послідовностей з бази даних Генбанку відібрали 21 послідовність ізолятів ВЯДЯ, виділених у різних країнах зі зразків груші та яблуні, що мали різний ступінь гомології з досліджуваними ампліконами (див. табл. 3).

Після вирівнювання послідовностей будували філогенетичне дерево ізолятів ВЯДЯ за допомогою програми MEGA 4 [4], використовуючи метод з'єднання найближчих сусідів [7] (рис. 2). Як корінь філограми використали ізолят латентного вірусу абрикоса (ЛВА). Дані бутстреп аналізу (1000 реплік) [2] відображені у вузлах філогенетичного дерева.

Ізолят ASPV-42 виявився найподібнішим до грушевого ізоляту з Польщі AF345895 – 96 % ідентичності. Інші ізоляти ВЯДЯ в субкластері 1 походять з Німеччини (D21828 і D21829) – по 91 % гомології, Польщі (AF345893), Чехії (AJ968944) та Тайваню (HM352767) – по 90 % (табл. 3). Ізолят ASPV-39 сформував субкластер 2 з ізолятами з Китаю (з груші EU708018 – 88 % та яблуні HM125159 – 89 % ідентичності) та Польщі (грушеві ізоляти AF491929 та AF345894 – по 87 %).

Загалом у два субкластери з українськими ізолятами, виділеними з груші, увійшло 10 відомих ізолятів вірусу ямкуватості деревини яблуні, з яких сім – із зразків груші і три – з яблуні.

Третій та четвертий субкластери утворилися з 10 ізолятів, 9 з яких було виділено зі зразків яблуні та один з груші, що походить з Індії. Крім того, до субкластеру 4 увійшли відомі українські ізоляти ВЯДЯ, виділені з яблуні, що свідчить про віддаленість ізолятів вірусу, виділених в Україні з рослин видів *Pyrus communis L.* і *Malus domestica Borkh.*

Таким чином, можна відзначити, що кластеризація відбулася переважно на основі рослини-хазяїна, тоді як вплив географічного походження не виявлено. До таких самих висновків дійшли науковці з Китаю, які проводили

філогенетичний аналіз повнорозмірного гена капсидного білка шести яблуневих та семи грушевих місцевих ізолятів з відомими послідовностями [6].

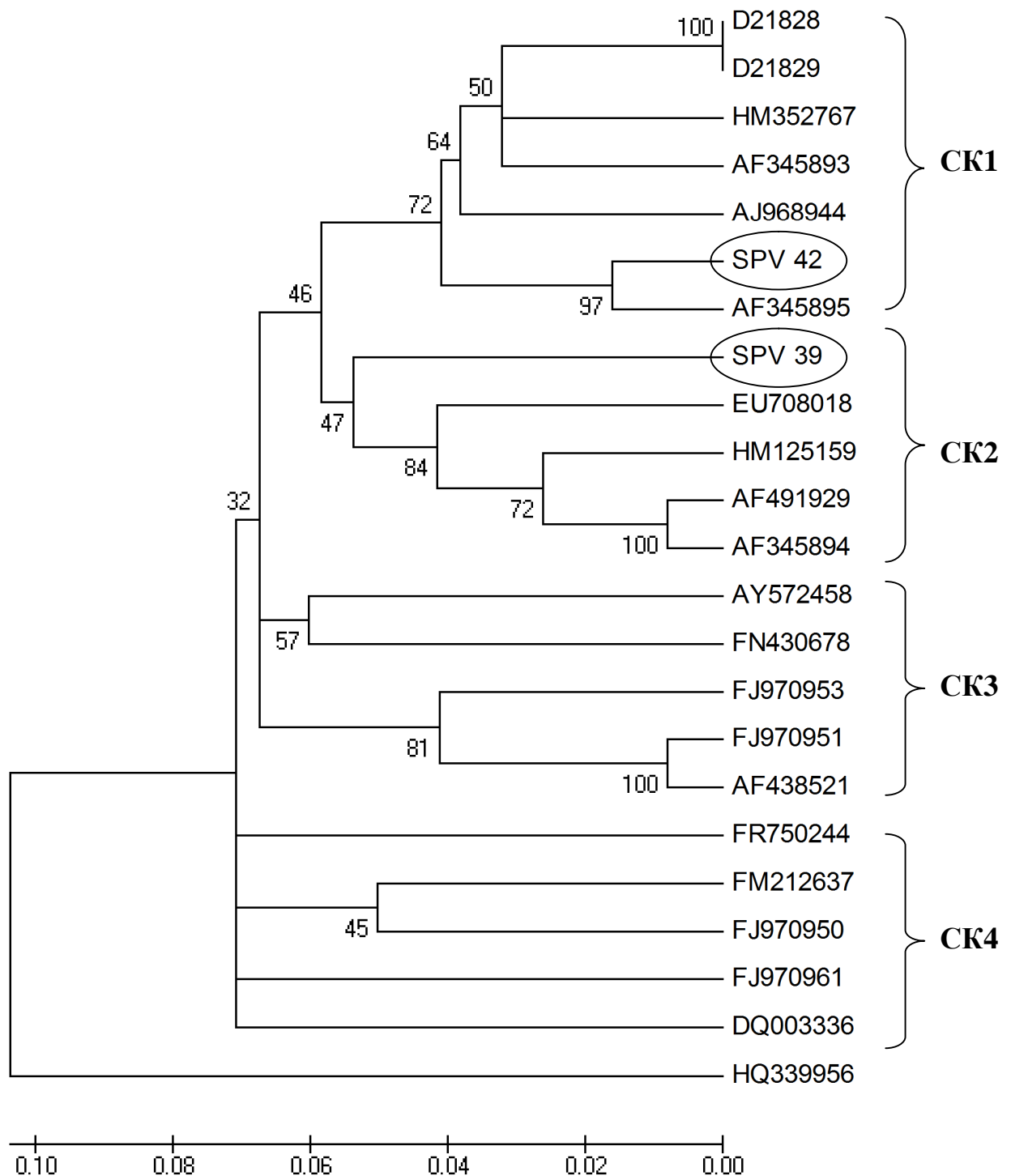


Рис. 2. Філогенетичне дерево, сконструйоване з використанням послідовностей фрагмента гена капсидного білка ізолятів ВЯДЯ та ЛВА.

СК1, СК2, СК3, СК4 – субкластер відповідно 1, 2, 3 і 4.

Найвірогіднішими країнами походження українських ізолятів є Польща, з якою відбувається активний обмін садивним матеріалом, та, можливо, Китай, з

якого Інститутом садівництва було завезено садивний матеріал груші групи Наші для використання в селекційних програмах.

При порівнянні фрагментів амінокислотних послідовностей ASPV-39 і ASPV-42 з уже відомими ізолятами ВЯДЯ виявлено вищий рівень ідентичності, який коливався від 91 до 98 % (див. табл. 2), що свідчить про переважно синонімічні заміни в нуклеотидній послідовності.

ВИСНОВКИ

1. Проведено ЗТ-ПЛР діагностику зразків груші та виділено українські ізоляти ВЯДЯ.
2. Встановлено, що українські ізоляти ВЯДЯ найбільш споріднені з ізолятами з Польщі та Китаю.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

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. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // *Evolution*. – 1985. – 39. – P. 783–791.
3. Genome heterogeneity of *Apple stem pitting virus* in apple trees / N. Yoshikawa, H. Matsuda, Y. Oda [et al.] // *Acta Horticultrae*. – 2001. – № 550. – P. 167-174.
4. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. / [K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar] // *Molecular Biology and Evolution*. – 2007. – Vol. 24. – P. 1596–1599.
5. 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 // *Journal of Virological Methods* – 2002. – Vol. 99. – P. 81–92.
6. RT-PCR detection and molecular variability of *Apple stem pitting virus* / L. Li, Z. Zhang, Zh. Zhang [et al.] // *Acta Horticulturae Sinica*. – 2010. – Vol. 37. – № 1. – P. 9–14.

7. Saitou N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – Vol. 4. – P. 406–425.
8. Takezaki N. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees / N. Takezaki, A. Rzhetsky, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. – 2004. – Vol. 12. – P. 823–833.
9. 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. – № 149. – P. 1045–1060.
10. Thompson J.D. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice / J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – P. 4673-4680.

ДЕТЕКЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА ЯМЧАТОСТИ ДРЕВЕСИНЫ ЯБЛОНИ, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГРУШИ

Е.Н. Удовиченко, В.М. Удовиченко, И.Г. Будзанивская, В.П. Полищук

Проведена ОТ-ПЦР диагностика образцов груши на наличие вируса ямчатости древесины яблони, выделены украинские изоляты и получен сиквенс фрагментов гена капсидного белка. Проведен филогенетический анализ и установлены уровни гомологии их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с известными изолятами.

Ключевые слова: *вирус ямчатости древесины яблони, груша, ОТ-ПЦР, филогенетика*

DETECTION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF APPLE STEM PITTING VIRUS ISOLATED FROM PEAR SAMPLES

K.M. Udovychenko, V.M. Udovychenko, I.G. Budznivska, V.P. Polischuk

RT-PCR of Apple Stem Pitting Virus of pear samples was conducted and sequence of part of coat protein gene of Ukrainian virus isolates was made. Phylogenetic analysis of nucleic and amino acid sequences of Ukrainian and known isolates was carried out and level of homology was established.

Key words: *Apple Stem Pitting Virus, pear, RT-PCR, phylogenetics*