

УДК 578.865

**ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ВІРУСУ МОЗАЇКИ ТОМАТУ,
ВИДІЛЕНОГО З НАСІННЯ *LYCOPERSICON ESCULENTUM L.***

Е. АльДалаін, аспірант* , О. С. Бондар, магістр,

О. В. Тимчишин, бакалавр,

Т. П. Шевченко, кандидат біологічних наук,

І. Г. Будзанівська, В. П. Поліщук, доктори біологічних наук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,

ННЦ «Інститут біології»

*Здійснено перевірку насіння *Lycopersicon esculentum L.* на контамінацію вірусом мозаїки томату (ВМТо), який є типовим патогеном цих рослин. Виявлення вірусних антигенів проводили за допомогою ІФА. Серед перевірених сортів насіння 40% були контаміновані ВМТо. Отримано та проаналізовано послідовність гена капсидного білка українського ізоляту ВМТо (ТоMV-ukr3). Філогенетичне дерево на основі гена капсидного білка українського ізоляту та штамів з Genbank продемонструвало його гомологію з відомими штамми в діапазоні 96-99%. У результаті проведеного філогенетичного аналізу та порівняння ВМТо-ukr3 з охарактеризованими штамми ВМТо було встановлено, що виділений патоген є спорідненим до штамів ВМТо-1-2, ВМТо-G26 та ВМТо-G6.*

Ключові слова: *ВМТо, *Lycopersicon esculentum L.*, насіння, філогенетичний аналіз*

Помідор (*Lycopersicon esculentum L.*) – важлива сільськогосподарська культура в Україні. Його рослини чутливі до багатьох вірусних хвороб, зокрема до спричинених вірусом мозаїки томату [1, 8]. Цей патоген належить до роду

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор В. П. Поліщук

Tobamovirus родини *Virgaviridae* [11]. Ураження ВМТо може призводити до зменшення кількості та якості врожаю помідорів і завдавати економічних збитків сільському господарству.

Здатність розповсюджуватись за допомогою насіння є ключовою для швидкого поширення ВМТо на великі відстані. Саме тому контроль якості насіння, використання безвірусного насінневого матеріалу, розробка і впровадження сертифікаційних програм є найбільш ефективними заходами для запобігання виникнення нових спалахів ВМТо [7].

Метою дослідження було перевірити насіння *L. esculentum L.* на контамінацію ВМТо та провести філогенетичний аналіз гена капсидного білка ВМТо.

Матеріали і методи досліджень. Для аналізу відібрали насіння помідорів українського виробництва десяти різних сортів: Перцевидний, Черрі, Ведмежа лапа, Рожеві щічки, Український велетень, Новинка Придністров'я, Оберіг, Санька, Вогні Москви, Волове серце рожеве. Перед проведенням серологічних тестів насіння пророщували у стерильних чашках Петрі за температури 20⁰С протягом 7 днів. Потім пророщене насіння гомогенізували у 0.1М фосфатно-сольовому буфері, рН 7,4 у співвідношені 1:3 (m/v). Отриманий гомогенат центрифугували у режимі 5000 об/хв протягом 20 хв при температурі 4° С на центрифугі РС-6 для очистки матеріалу від рослинних компонентів. Відібраний надосад використовували для подальшої діагностики вірусних антигенів.

Для тестування насіння на наявність вірусних антигенів застосовували ІФА у модифікації «сендвіч» [3] у 96-лункових полістиролових планшетах (Labsystem, Фінляндія). Постановку ІФА здійснювали з використанням тест-систем виробництва Loewe (Німеччина) згідно з рекомендаціями виробника. При проведенні аналізу використовували стандартні (позитивні та негативні) комерційні контролі. Для статистичної достовірності кожен із дослідних зразків під час постановки ІФА аналізували у трикратній повторності. Результати реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsi MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink за довжини хвиль 405/630 нм [3].

Морфологію віріонів досліджували за допомогою електронного мікроскопа Jeogs (JEM-1400). Як контрастер використовували 2%-ний ураніл ацетат [4]. Тотальна РНК була виділена із зразків насіння, контамінованого ВМТо, з використанням RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Велика Британія). Ефективність виділення перевіряли за допомогою горизонтального електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Отриману РНК використовували як матрицю для постановки зворотнотранскрипційної полімеразноланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР). Для ЗТ-ПЛР використовували відомі з літературних даних праймери, специфічні до гена капсидного білка ВМТо (продукт 700 п.н) [5]:

прямий праймер – CGGAAGGCCTAAACCAAAAAG;

Tob-Uni1 праймер – ATTTAAGTGGAGGGAAAAACACT.

Для візуалізації продуктів ЗТ-ПЛР використовували горизонтальний електрофорез в 1%-ному агарозному гелі. Отримані очищені ампліфіковані фрагменти були сиквензовані. Послідовність гена капсидного білка порівнювали з послідовностями відомих штамів, використовуючи NCBI/BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Філогенетичний аналіз проводили за допомогою програми MEGA6 з використанням методу максимальної подібності на основі 3-параметричної моделі Тамури [10] з 1000 бутстреп-реплікацій.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті проведеного ІФА було виявлено, що чотири з десяти проаналізованих сортів насіння помідора контаміновані антигенами вірусу мозаїки томату. У зразку насіння Ведмежа лапа спостерігався найвищий титр вірусу, тому цей зразок обрали для подальших досліджень.

Використовуючи електронно-мікроскопічні дослідження, було візуалізовано паличкоподібні вірусні частки розміром $300\pm 3 \times 19\pm 3$ нм, що характерні для ВМТо за літературними даними (рис.1).

У результаті ЗТ-ПЛР з тотальною РНК, виділеною з контамінованого насіння сорту Ведмежа лапа, була отримана кДНК довжиною 700 п.н. (рис.2).

Послідовність гена капсидного білка (480 п.н.) порівнювали з послідовностями відомих штамів, використовуючи NCBI/BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Виявлений ізолят (ТоMV-ukr3) найбільш подібний до групи тобамовірусів, що в основному вражають рослини з родини Пасльонових (*Tomato mosaic virus*, *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mottle mosaic virus* (ТоММV), *Pepper mild mottle virus* (РММoV)).

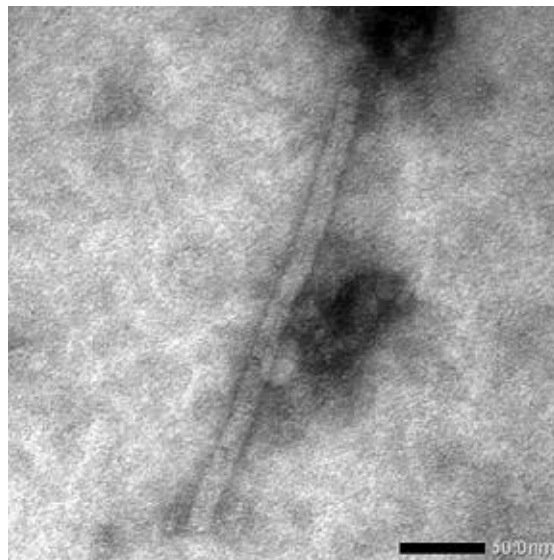
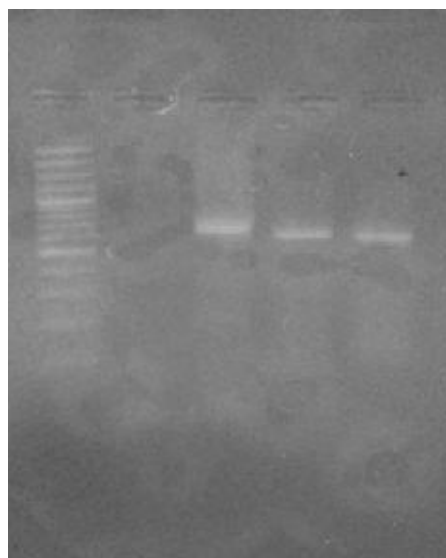


Рис. 1. Електронно-мікроскопічне зображення вірусу мозаїки томатів



М 1 2

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР ВМТо: М – маркери (100 bp, Fermentas), 1,2 – κДНК гена капсидного білка. Розмір продукту – 700 bp

Для роду *Tobamovirus* штами, які проявляють менше ніж 90% подібності за порівняння сиквенсів нукленових кислот, вважаються різними видами [6]. Найвищий відсоток подібності послідовності гена капсидного білка ТоMV-ukr3

спостерігався відносно різних штамів ВМТо (96-99%), водночас набагато меншу подібність спостерігали зі штамами ТМV (74-79%), РММoV (71-73%) та ТоММV (85%). Дані результати підтверджують приналежність виявленого ізолята до ВМТо.

Філогенетичне дерево побудовано за методом максимальної подібності у програмі МЕGА6 (рис. 3).

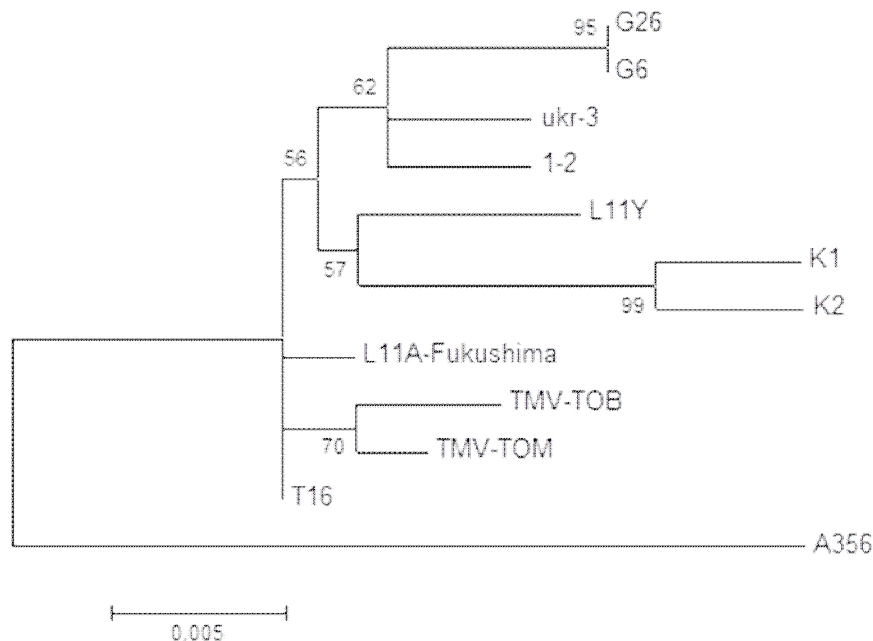


Рис. 3. Філогенетичне дерево для гена капсидного білка ВМТо, побудоване у програмі МЕGА6 за допомогою методу максимальної подібності

Як видно з рисунку, усі досліджувані штами, окрім ВМТо-А356, виявляли близьку спорідненість, утворювали один кластер і мали єдиного спільного предка. Їх гомологія з українським ізолятом становила 98-99%. На філограмі спостерігається утворення субкластера ВМТо-ukr3 зі штамами ВМТо-1-2 (Німеччина), ВМТо-G26 та ВМТо-G6 (Іран). Ці штами є близькоспорідненими до українського ізолята, гомологія їхніх нуклеотидних послідовностей становить близько 99%. Штам ТоМV-А356 виявляв найменший відсоток гомології (96%) з українським ізолятом (таблиця). Таку низьку гомологію можна пояснити тим, що цей штам був виділений із волошок

(*Centaurea sp.*), що належать до родини *Asteraceae*, а для тобамовірусів характерна сильна кореляція з їхніми покритонасінними хазяями [9].

Гомологія послідовностей гена капсидного білка українського ізоляту ВМТо та відомих штамів з Genbank

Штами з Genbank	Хазяїн (якщо відомий)	Номер	Гомологія нуклеотидних послідовностей,%
ToMV-K2		Z92909	98,1%
ToMV-K1		AJ243571	98,1%
ToMV-L11Y	<i>Nicotiana sp.</i>	AB355139	98,74%
ToMV-G26	<i>L.esculentum L.</i>	HQ593627	98,94%
ToMV-1-2		DQ873692	99,16%
ToMV-G6	<i>Solanum melongena L.</i>	HQ593624	98,94%
ToMV-L11A-Fukushima		AB083196	99,16%
ToMV-T16		HQ593626	99,37%
ToMV-A356	<i>Centaurea sp.</i>	KF527464	96,37%
TMV-TOB	<i>Nicotiana sp.</i>	AF103780	98,7%
TMV-TOM	<i>L. esculentum L.</i>	AF103779	98,9%

Висновки

На основі проведеного філогенетичного аналізу можна стверджувати, що виявлений ізолят не належить до емерджентних штамів, які долають стійкість різних видів рослин проти вірусу [12]. Тому можна використовувати відомі стратегії боротьби з хворобами, спричиненими цим патогеном [2]. Зважаючи на великий відсоток контамінованого насіння серед проаналізованого, заходи боротьби з ВМТо мають проводитись перед висаджуванням у ґрунт. Зокрема можна застосовувати безвірусний насінневий матеріал і стійкі сорти помідорів.

Список літератури

1. Болезни и вредители овощных культур и картофеля / [А. Ахатов, Ф. Ганнибал, Ю. Мешков и др.] – М.:Товарищество научных зданий КМК, 2013. – 463с.
2. Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби: Методичні рекомендації/ [Т. О. Руднева, Т. П.Шевченко, В. П. Поліщук, А. Л. Бойко] – К.:ЦОП «Глобус», – 2012. – 23с.

3. Crowther J.R. (Ed.) ELISA. Theory and practice, Humana Press, N.Y. – 1995. – 223 p.
4. Dijkstra J. Practical Plant Virology: Protocols And Exercises / J. Dijkstra, Cees P. de Jager. – Berlin: – Springer-Verlag and Heidelberg GmbH & Co, 1998. – 459 p.
5. Letschert B. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP/ B. Letschert, G. Adam, D.-E. Lesemann [et all.] //Journal of Virological Methods. – 2002. – Vol. 106. – P. 1 – 10.
6. Li R. Complete Genome Sequence of a New Tobamovirus Naturally Infecting Tomatoes in Mexico/ R. Li, S. Gao, Z. Fei, K.-S. Ling // Genome Announcements. – 2013. – Vol.1. – N.5.
7. Sastry K. Subramanya Seed-borne plant virus diseases/ K. S. Sastry– Berlin:Springer, 2013. – 327p.
8. Silva P. P. Detection of tomato mosaic virus in tomato seed and treatment by thermotherapy / P. P. Silva, R.A. Freitas, W.M. Nascimento // Acta Horticulturae. – 2011. – Vol. 917. – P. 303-308.
9. Co-divergence and host-switching in the evolution of tobamoviruses/ A.H. Stobbe, U. Melcher, M.W. Palmer [et all.] // Journal of General Virology. – 2012. – Vol.93. – P. 408-418.
10. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees / K. Tamura, M. Nei // Molecular Biology and Evolution – 1993 – Vol.10 – P. 512-526.
11. Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / [A. King, M. Adams, E. Lefkowitz et all.] – London: Academic Press, 2012. – 1327p.
12. Missense Mutation in Tomato mosaic virus L11A-Fukushima Genome Determines Its Symptomless Systemic Infection of Tomato / H. A. Yamamoto, T. Abe, K. Ueda [et all.] //Journal of General Plant Pathology. – 2002. – Vol. 68. – P. 385-389.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСА МОЗАИКИ ТОМАТА, ИЗОЛИРОВАННОГО ИЗ СЕМЯН *LYCOPERSICON ESCULENTUM L.*

Е. Аль Далаин, А.С. Бондарь, О. В. Тымчишин, Т.П. Шевченко,
И.Г. Будзанивская, В.П. Полищук

*Проведена проверка семян *Lycopersicon esculentum L.* на контаминацию вирусом мозаики томата (ВМТо), типичного патогена этих растений. Детекцию вирусных антигенов проводили с помощью ИФА. Из проверенных сортов семян 40% были контаминированные ВМТо. Получена и проанализирована последовательность гена капсидного белка украинского изолята ВМТо (ТоMV-ukr3). Филогенетическое дерево на основании гена капсидного белка украинского изолята и штаммов с Genbank продемонстрировало его гомологию с известными штаммами в диапазоне 96-99%. В результате проведенного филогенетического анализа и сравнения ВМТо-ukr3 с охарактеризованными штаммами ВМТо было установлено, что выделенный патоген является родственным к штаммам ВМТо-1-2, ВМТо-G26 и ВМТо-G6.*

Ключевые слова: *ВМТо, *Lycopersicon esculentum L.*, семена, филогенетический анализ*

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TOMATO MOSAIC VIRUS ISOLATED FROM SEEDS OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM L.*

Е. AlDalain, O.S. Bondar, O.V. Tymchyshyn, T.P. Shevchenko,
I.G. Budzanivska, V.P. Polishchuk

Tomato seeds of different cultivars were checked for contamination with Tomato mosaic virus (ToMV), typical pathogen of these vegetable crops in Ukraine. The incidence of viral contaminations was determined using ELISA. Approximately 40% of seed samples were contaminated with ToMV. The coat protein (CP) gene sequence of Ukrainian isolate (ToMV-ukr3) was obtained and analyzed. Phylogenetic tree based on complete CP sequences of Ukrainian isolate and strains available in

Genbank was constructed in Mega 6. Comparison of nucleotide sequences of obtained isolate with those of other ToMV strains in Genbank confirmed that detected pathogen is isolate of Tomato mosaic virus. CP sequence of ToMV-ukr3 revealed 96-99% nucleotide homology with existing ToMV strains. ToMV-ukr3 was the most related to strains ToMV-1-2, ToMV-G26 and ToMV-G6.

Key words: *ToMV, Lycopersicon esculentum L., seeds, phylogenetic analysis*