



УДК 632.38 575.86 634.13

## ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОЇ СПОРІДНЕНОСТІ ДЕЯКИХ УКРАЇНСЬКИХ ІЗОЛЯТИВ ВІРУСІВ ЯБЛУНІ

**К. М. УДОВИЧЕНКО**, кандидат біологічних наук

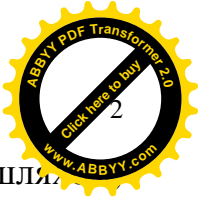
*Інститут садівництва (ІС) НААН України*

*E-mail: sad-institut@ukr.net*

**Анотація.** *Методом ЗТ-ПЛР в насадженнях груші було ідентифіковано віруси ЯДЯ, ХПЛЯ, БДЯ та виділено їх ізоляти. Виявлено високий рівень ідентичності між українськими ізолятами ВБДЯ – 99 % та низький рівень ідентичності між ізолятами ВЯДЯ (89 %) і ВХПЛЯ (87 %). Показано, що нуклеотидна послідовність ізоляту ASPV-39 є найбільш ідентичною з ізолятом з Китаю (89 %), ASPV-42 – з ізолятом з Польщі (96 %), ASGV-44 та ASGV-46 мали найвищий рівень подібності з ізолятами з Чехії, Туреччини та Індії (99 %), ACLSV-43 – з ізолятами з Албанії, Канади, та Японії (94 %), ACLSV-49 – з ізолятом з Канади (93 %).*

**Ключові слова:** *віруси груші, ПЛР, філогенетичний аналіз*

Європейська схема сертифікації садивного матеріалу плодових і ягідних культур передбачає проведення контролю збудників різної природи відповідно до стандартів Європейської організації з захисту рослин. На сьогодні в Україні також впроваджуються новітні схеми стандартизації і сертифікації матеріалу, що відповідають європейським вимогам і передбачають контроль вірусних, фітоплазмових, віроїдних та вірусоподібних захворювань. Зокрема, для груші важливу роль відіграють віруси родини *Flexiviridae*, що передаються із соком рослини: хлоротичної плямистості листя яблуні (ВХПЛЯ, *Apple Chlorotic Leaf Spot Virus*), борознистості деревини яблуні (ВБДЯ, *Apple Stem Grooving Virus*) і ямкуватості деревини яблуні (ВЯДЯ, *Apple Stem Pitting Virus*). Вегетативний спосіб розмноження сортового і підщепного садивного матеріалу груші, відсутність зовнішніх проявів ураження цими вірусами у більшості комерційних сортів і відсутність систематичного фітовірусологічного контролю за насадженнями сприяли накопиченню та поширенню вірусних інфекцій в Україні.



Оскільки ВЯДЯ, ВХПЛЯ і ВБДЯ передаються лише механічним шляхом, найефективнішим способом боротьби з ними є достовірна діагностика їх у вихідному матеріалі, виключення зі схем розмноження вірусифікованого та подальше використання лише безвірусного садивного матеріалу. Розробка ефективних схем діагностики вірусів з використанням сучасних біотехнологічних методів детекції (ІФА, ПЛР) на основі ідентифікації місцевих ізолятів та встановленні їх філогенетичних зв'язків забезпечують високий рівень контролю якості садивного матеріалу. Розробка ефективних схем діагностики вірусів із використанням сучасних біотехнологічних методів детекції (ІФА, ПЛР) для ідентифікації місцевих ізолятів та проведення філогенетичного аналізу для встановлення їх генетичної спорідненості з раніше вивченими ізолятами забезпечить високий рівень контролю якості садивного матеріалу.

**Матеріали і методика досліджень.** Зразки груші для тестування відбирали у плодоносних насадженнях Інституту садівництва НААН. Детекцію вірусів у зразках груші проводили методом ЗТ-ПЛР.

Для виділення тотальної РНК використовували бруньки, що набухли, або молоде листя груші. Екстракцію РНК зі зразків груші проводили за допомогою комерційних наборів «RNeasy Plant Mini Kit» виробництва «Qiagen» (Великобританія) та «DNA Purification kit» виробництва «Fermentas» (Латвія) згідно з рекомендаціями виробника. Контроль якості виділення РНК проводили за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі або за допомогою крапельного спектрофотометра NanoDrop 1000.

Для виявлення ВБДЯ, ВЯДЯ та ВХПЛЯ використовували пари праймерів до фрагмента гена капсидного білка вірусів: ACLSV-s, ACLSV-as (677 пн); ASPV-s, ASPV-as (370 пн); ASGV-s, ASGV-as (273 пн) та праймери до внутрішнього контролю *Nad5-s*, *Nad5-as* (181 пн) [1]. Постановку ЗТ-ПЛР для детекції кожного вірусу проводили окремо або з одночасною ампліфікацією внутрішнього контролю *nad5*.

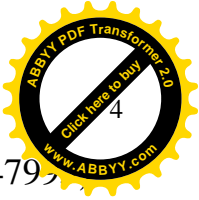


Для проведення ЗТ-ПЛР використовували комерційний набір «Invitrogen SuperScript III One-Step RT-PCR». Постановку реакції проводили відповідно до рекомендацій виробника. Реєстрацію результатів реакції виконували за допомогою електрофорезу отриманих ампліконів у 2 % агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в однократному TBE буфері.

Після секвенування ідентифікацію і порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей досліджуваних вірусів проводили за допомогою родини програм BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Множинне вирівнювання послідовностей виконували за допомогою програм CLUSTAL W та MEGA 5 [2]. Побудову філогенетичних дерев ізолятів – за допомогою програми MEGA 5, використовуючи метод приєднання найближчих сусідів (Neighbor-Joining, NJ) [3] та максимальної правдоподібності [4]. Для перевірки достовірності дерев застосовували бутстреп аналіз (1000 реплікацій).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Для діагностики досліджуваних вірусів різними авторами підбрано цілий ряд праймерів до генів капсидного білка та РНК-залежної-РНК-полімерази. Через доволі високий рівень мутацій вірусних геномів, для ЗТ-ПЛР необхідно використовувати праймери до найбільш консервативних ділянок. Оскільки, навіть кілька неспівпадінь у нуклеотидних послідовностях праймера та вірусу, особливо у 3`-ділянці праймера, можуть повністю нівелювати ампліфікацію і призвести до появи хибнонегативних результатів. Нами було обрано праймерні пари ASPV-s, ASPV-as, ACLSV-s, ACLSV-as та ASGV-s, ASGV-as до ділянок гена капсидного білка кожного з вірусів [1]. Саме ці праймери давали найбільш достовірні результати і були рекомендовані іншими дослідниками за діагностики українських ізолятів даних вірусів, виділених зі зразків яблуні [5]. Ампліфіковані фрагменти гена капсидного білка ВЯДЯ, ВХПЛЯ і ВБДЯ, отримані за результатами ЗТ-ПЛР, було просеквеновано та проведено філогенетичний аналіз ізолятів.

Два амплікони фрагментів геному вірусу ямкуватості деревини яблуні було просеквеновано і депоновано в базу даних Генбанку: ASPV-39 (JQ898516)



– ізолят, виділений зі зразка сорту Гранд Чемпіон 1-51, ASPV-42 (JQ2479), ізолят зі зразка сорту Улюблена Клаппа 1-59.

За допомогою родини програм BLAST було виявлено, що рівень ідентичності між фрагментами українських ізолятів ВЯДЯ, виділених з інфікованих зразків груші, складає 89 %, що свідчить про високий рівень варіабельності цієї ділянки їх геному.

Подальший пошук гомологічних послідовностей в базі даних Генбанку ([www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)) показав, що амплікон ASPV-39 має найвищий рівень ідентичності нуклеотидної послідовності з ізолятами ВЯДЯ з Китаю (номер доступу NM125159 та EU708018) і Чехії (AJ968944). Найнижчу подібність спостерігали з ізолятами вірусу зірчастої плямистості персика (AF318061, Франція) та латентного вірусу абрикоса (ЛВА, HQ339956, Італія) – 77 і 76 % відповідно. Нуклеотидна послідовність амплікона ASPV-42 була найбільш подібною до ізоляту ВЯДЯ (AF345895), що походить з Польщі – 96 %. Рівень ідентичності 91 % спостерігали з ізолятами ВЯДЯ з Китаю (NM125159) та вірусу пожовтіння жилок груші (PVYV) з Німеччини (D21828). Найнижчий відсоток ідентичності спостерігали з ізолятами латентного вірусу абрикоса (HQ339956, Італія) та вірусу димчастої кільцевої плямистості персика (AF318062, Італія) – 78 %.

Для філогенетичного аналізу отриманих послідовностей з бази даних Генбанку було відібрано послідовності ізолятів ВЯДЯ, що мали з ними найбільший рівень гомології. Аналіз отриманої філодендрограми продемонстрував, що кластеризація більшою мірою віддзеркалює видову приналежність рослин-хазяїв і не відображає географічне походження ізолятів вірусу (Рис.1). Низький рівень ідентичності ізоляту ASPV-39 з відомими та українськими ізолятами може свідчити про циркуляцію в Україні окремого штаму цього вірусу [6].

Найвірогіднішими країнами, звідки можуть походити або, навпаки, куди були завезені українські ізоляти, є Польща, з якою відбувається активний обмін садивним матеріалом, та Китай, з якого Інститутом садівництва міг бути



завезений інфікований садивний матеріал груші групи Наші або пересаджені українські сорти для використання в селекційних програмах.

Порівняння фрагментів амінокислотних послідовностей українських ізолятів ВДЯ з уже відомими виявило вищий рівень ідентичності, який коливався в межах від 91 до 98 %, що свідчить про переважно синонімічні заміни в нуклеотидній послідовності.

Для аналізу українських ізолятів ВБДЯ було просеквеновано і внесено в базу даних Генбанку два амплікони фрагментів гена капсидного білка: ASGV-44 (JQ866624) – ізолят, виділений з гібриду 4-34, та ASGV-46 (JQ866625) – з сорту Юта 1-16.

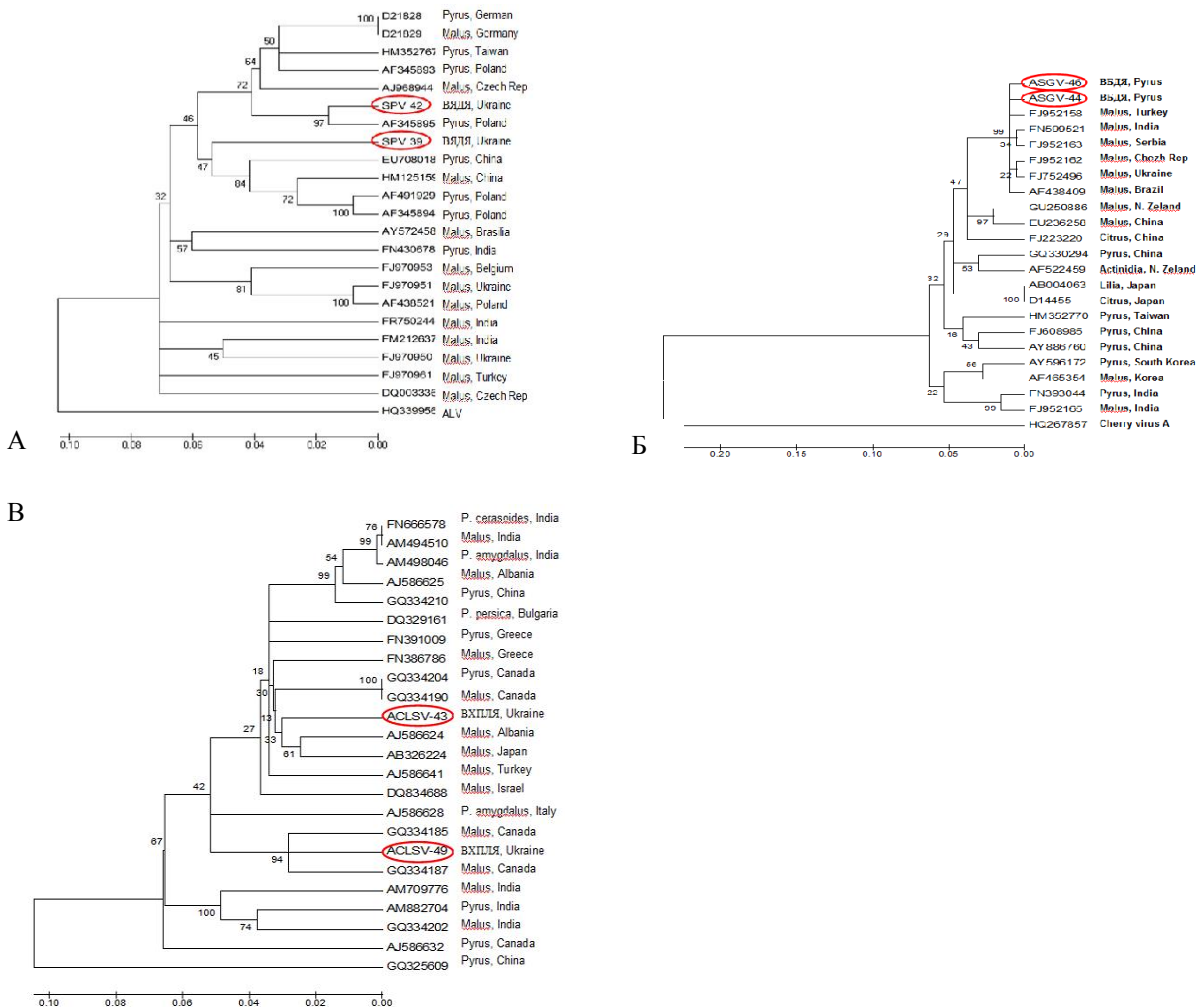
Порівняння нуклеотидних послідовностей ампліконів ASGV-44 та ASGV-46 виявило 99 %-ий рівень їх ідентичності, що є дуже високим і свідчить про консервативність даної ділянки гена капсидного білка.

Пошук відомих послідовностей, гомологічних українським ізолятам, в базі даних Генбанку виявив, що обидва амплікони – ASGV-44 та ASGV-46 мали найвищий рівень подібності з чеським (FJ952162), турецьким (FJ952158) та індійським (FN599521) ізолятами ВБДЯ, виділеними з яблуні – 98-99 %. Найнижчий рівень ідентичності ASGV-44 та ASGV-46 був з ізолятом із Кореї (AF465354) – 83 %.

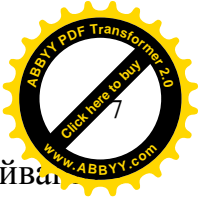
Для проведення філогенетичного аналізу з бази даних Генбанку було відібрано 20 відомих послідовностей ізолятів ВБДЯ та кудлатості листя цитрусових (ВКЛЦ, Citrus tatter leaf virus, CiTLV). За результатами вирівнювання було побудовано філогенетичне дерево (Рис.1). Найбільш близькими до ізолятів ASGV-44 та ASGV-46 виявився ізолят з Туреччини, виділений з яблуні. В цей же кластер потрапили ізоляти з Індії (FN599521), Сербії, Чехії, Бразилії та України, які теж були виділені з яблуні. Цікаво, що українські ізоляти ВБДЯ, виділені з груші та яблуні, згрупувалися в одному кластері і мають високий рівень ідентичності – 98 %. Водночас ізоляти, виділені з груші в інших країнах, згрупувалися в різні субкластери. Ймовірною причиною такого розподілу є те, що всі грушеві ізоляти, сиквенси яких відомі

на сьогоднішній день, походять з країн Східної Азії (Тайваню, КНР, Південної Кореї) та Індії територіально близьких між собою. Таким чином, яблуневі ізоляти зі Східної Європи виявилися менш віддаленими від досліджуваних ізолятів, ніж ізоляти з Південно-Східної Азії.

Наші результати подібні до результатів філогенетичного аналізу ізолятів ВБДЯ з яблуні, японської груші і європейської груші, проведеного Magome et al., який виявив, що амінокислотні послідовності капсидного білка 21 проаналізованого ізоляту мали рівень ідентичності від 92,4 до 100 %, а розподіл у кластерах філогенетичного дерева відбувався незалежно від хазяїна чи країни походження [7].



**Рис. 1. Філогенетичні дерева, побудовані з використанням послідовностей фрагмента гена капсидного білка ізолятів: А – ВДЯ; Б – ВБДЯ; В – ВХПЛЯ.**



В іншому дослідженні, де порівнювали ізоляти переважно з Китаю, Тайвані, Японії, відзначали низьку дивергенцію нуклеотидних послідовностей, хоча ізоляти з груші утворили близькі субкластери, відокремившись від лілійних, цитрусових та яблуневих [8].

Порівняння амінокислотних послідовностей показало вищий рівень подібності між ізолятами в межах 92-100 %, що загалом характерно для гена капсидного білка вірусу борознистості деревини яблуні.

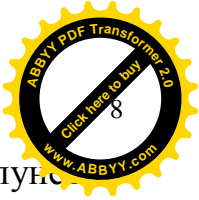
Секвенування нуклеотидних послідовностей фрагмента гена капсидного білка вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні було здійснено для двох ампліконів: ACLSV-43 – ізолят, виділений з сорту Конкорд 5-13 та ACLSV-49 – ізолят з сорту Смерічка 12-60. Інформацію про нуклеотидні послідовності даних ізолятів було внесено до бази даних Генбанку та присвоєно номери: ACLSV-43 – JQ866622 та ACLSV-49 – JQ866623.

Рівень ідентичності просеквенованих нуклеотидних послідовностей ВХПЛЯ склав лише 87 %, що свідчить про можливе 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) – відповідно 93 та 92 % [9].

Для вирівнювання послідовностей і побудови філогенетичного дерева в базі даних Генбанку було відібрано гомологічні послідовності 24 ізоляти ВХПЛЯ, що походять з різних країн світу та виділені з широкого кола господарів (груші, яблуні, сливи, абрикоса, персика та мигдалю) (Рис.1).

На побудованій філограмі українські ізоляти ВХПЛЯ увійшли в різні кластери. Ізолят ACLSV-43 увійшов у субкластер 1 разом з ізолятами з Албанії і Японії, що характеризувались найвищим рівнем ідентичності – 94 %.



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

Таким чином, філогенетичний аналіз не виявив чіткого розподілу українських і відомих ізолятів вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні за певною ознакою – будь то країна походження, чи рослина-хазяїн.

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

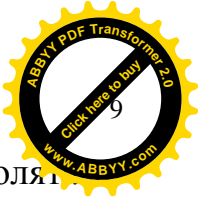
Аналіз амінокислотних послідовностей досліджуваних ізолятів ВХПЛЯ виявив, що ACLSV-43 та ACLSV-49 на 98 % ідентичні з ізолятом В6 (Японія), який входить до групи ізолятів ВХПЛЯ і характеризується консервативною амінокислотою комбінацією капсидного білка Ser40-Leu59-Tyr75-Thr130-Leu184. Дві амінокислоти, серин та тирозин, у позиціях відповідно 40 та 75, забезпечують і відіграють ключову роль в інфекційності вірусу, впливають на накопичення у інфікованих тканинах вірусної геномної РНК, дволанцюгової РНК та капсидного і білка руху [10].

Таким чином, ізоляти ВХПЛЯ з України продемонстрували досить низьку ідентичність за порівняння між собою і виявилися більш спорідненими з відомими послідовностями, що може свідчити про різні джерела їх походження та циркуляцію в Україні двох штамів цього вірусу.

### **Висновки**

1. Методом ЗТ-ПЛР в насадженнях груші було ідентифіковано віруси родини *Flexiviridae* – ВЯДЯ, ВХПЛЯ, ВБДЯ та виділено їх ізоляти і проведено філогенетичний аналіз українських ізолятів латентних вірусів яблуні, виділених з груші.





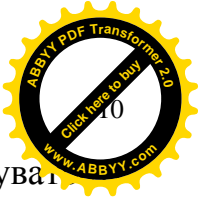
2. Показано високий рівень ідентичності між українськими ізолятами ВБДЯ – 99 % та низький рівень ідентичності між ізолятами ВВДЯ (89 %) і ВХПЛЯ (87 %).

3. Порівняння нуклеотидних послідовностей українських ізолятів вірусів груші з уже відомими ізолятами показало, що ASPV-39 є найбільш ідентичним з ізолятом із Китаю (89 %), ASPV-42 – з ізолятом із Польщі (96 %). Ізоляти ASGV-44 та ASGV-46 мали найвищий рівень подібності з ізолятами з Чехії, Туреччини та Індії (99 %). ACLSV-43 – мав найвищий рівень ідентичності з ізолятами з Албанії, Канади, та Японії (94 %), ACLSV-49 – з ізолятом із Канади (93%).

4. Низький рівень подібності ізоляту ASPV-39 з відомими ізолятами (в т.ч. з українськими) може свідчити про існування окремого штаму даного вірусу.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Tamura K. 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.
3. 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.
4. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases / K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution*. – 1992. – Vol. 9. – P.678-687.
5. Господарик А. В. Діагностика українських ізолятів вірусів яблуні методом ЗТ-ПЛР / [А. В. Господарик, І.Г. Будзанівська, В. П. Поліщук, Д. К. Кундю] // *Науковий вісник НАУ*. – 2008. – №129. – С. 147-163.



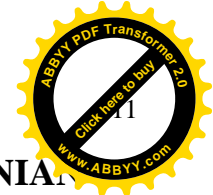
6. Удовиченко К. М. Детекція та філогенетичний аналіз вірусу ямкуват яблуні, виділеного з груші / [К. М. Удовиченко, В. М. Удовиченко, І. Г. Будзанівська, В. П. Поліщук] // Наукові доповіді НУБіП. – 2011. – №7(29).  
Доступ: [http://www.nbuu.gov.ua/e-journals/Nd/2011\\_7/11ukm.pdf](http://www.nbuu.gov.ua/e-journals/Nd/2011_7/11ukm.pdf)
7. Magome H. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees / H. Magome, N. Yoshikawa, T. Takahashi [et al.] // *Phytopathology*. – 1997. – Vol. 87. – P.389-396.
8. Wu Z.-B. Molecular and biological characterization of an isolate of *apple stem pitting virus* causing pear vein yellows disease in Taiwan / Z.-B. Wu, H.-M. Ku, C.-C. Su [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 92 (3). – P.721-728.
9. Удовиченко К. М. Молекулярно-філогенетичний аналіз українських ізолятів вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні, виділених з груші / К. М. Удовиченко // Вісник аграрної науки. – 2014. – №2. – С. 13-16.
10. Yaegashi H. 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. – Vol. 88. – P. 2611-2618.

## ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА НЕКОТОРЫХ УКРАИНСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСОВ ЯБЛОНИ

**К. Н. Удовиченко**

*Аннотация.* Методом ОТ-ПЦР в насаждениях груши были идентифицированы вирусы ЯДЯ, ХПЛЯ, БДЯ и выделены их изоляты. Выявлен высокий уровень идентичности между украинскими изолятами ВБДЯ – 99 % и низкий уровень идентичности между изолятами ВЯДЯ (89 %) и ВХПЛЯ (87 %). Показано, что нуклеотидная последовательность изолята ASPV-39 наиболее идентична с изолятом из Китая (89 %), ASPV-42 – с изолятом из Польши (96 %), ASGV-44 и ASGV-46 были наиболее подобны с изолятами из Чехии, Турции и Индии (99 %), ACLSV-43 – с изолятами из Албании, Канады и Японии (94 %), ACLSV-49 – с изолятом из Канады (93 %).

**Ключевые слова:** вирусы груши, ОТ-ПЦР, филогенетический анализ



# ASSESSMENT OF GENETIC RELATIONSHIP OF SOME UKRAINIAN ISOLATES OF APPLE VIRUSES

**K. Udovychenko**

**Abstract.** *Detection by RT-PCR and isolation of pear viruses ASPV, ACLSV and ASGV were conducted. High identity level was observed between Ukrainian isolates of ASPV – 99%, and rather low identity level demonstrated Ukrainian isolates of ASPV (89%) and ACLSV (87%). Nucleic sequence of isolate ASPV-39 showed 89% identity with isolate from China, ASPV-42 – 96% identity with isolate from Poland, ASGV-44 and ASGV-46 sequences were 99% identical with isolates from Czech Republic, Turkey and India, ACLSV-43 demonstrated 94% identity with isolates from Albany, Canada and Japan, ACLSV-49 – 93% identity with isolate from Canada.*

**Key words:** *pear viruses, RT-PCR, phylogenetic analysis*