



УДК 578.85/86

© 2010

А. В. Господарик, І. Г. Будзанівська, Д. К. Кунду, В. П. Поліщук

Молекулярно-біологічна характеристика українських ізолятів вірусу мозаїки яблуні, ізольованих з яблуні (*Malus domestica* Borkh.)

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

Визначено нуклеотидні послідовності фрагмента гена капсидного білка чотирьох українських ізолятів вірусу мозаїки яблуні, ізольованих з яблуні. Філогенетичний аналіз українських ізолятів вірусу мозаїки яблуні показав їх високу спорідненість як між собою, так і з відомими ізолятами в Ген банку.

На сьогодні відомо більше 40 вірусних та вірусоподібних захворювань зерняткових плодкових культур, однак найбільш економічно збитковими є хвороби яблуні, спричинені вірусом мозаїки яблуні (ВМЯ, *Apple mosaic virus*, *Parvivirus*), вірусом борознистості деревини яблуні (ВДЯ, *Apple stem grooving virus*), вірусом ямкуватості деревини яблуні (ВЯДЯ, *Apple stem pitting virus*), вірусом хлоротичної плямистості листя яблуні (ВХПЛЯ, *Apple chlorotic leaf spot virus*) [1]. ВМЯ інфікує близько 65 видів, включаючи яблуню, персик, ліщину, абрикос, хміль, з яких яблуня є однією з найпоширеніших плодкових культур в Україні. При ураженні ВМЯ відбувається зниження врожайності плодкових культур у середньому до 30–40%. За даними літератури, у США зниження врожаю яблуні сорту Голден Делішес досягає 46% [2].

За своїм таксономічним положенням ВМЯ належить до родини Bromoviridae, роду *Parvivirus*. Вірусні частки сферичної форми, без оболонки. Геном представлений трьома молекулами одноланцюгової лінійної смислової РНК з 5'-термінальними кеп-структурами. 3'-кінці молекул РНК не містять роуА-послідовностей. Також виявлена субгеномна матрична РНК — РНК-4, яка кодує капсидний білок [3]. Передача вірусу відбувається лише вегетативним шляхом та механічно, векторів не описано. Симптоми вірусу виявляються у вигляді яскраво-жовтої мозаїки, однак вони здатні маскуватися з підвищенням температури оточуючого середовища, що значно ускладнює виявлення вірусу.

З появою молекулярно-генетичних методів діагностики на основі визначення певних специфічних ділянок геному збудника, таких як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) та зворотно-транскрипційна полімеразна ланцюгова реакція (ЗТ-ПЛР), стало можливим не тільки ефективно діагностувати вірусні інфекції, але й аналізувати отримані кДНК щодо

їх спорідненості між собою, тобто робити як порівняльний, так і філогенетичний аналіз того чи іншого вірусу.

Нами досліджено молекулярно-біологічні особливості гена капсидного білка українських ізолятів ВМЯ, ізольованих з яблуні, та виконано порівняння їх як між собою, так і з іншими відомими послідовностями в Ген банку.

Матеріали та методи. Рослинним матеріалом були зразки яблуні (листя та пелюстки) сорту Слава Переможцям, Пінова, Внучка та Рубінове Дуки, відібрані в травні-червні 2008 р. з дослідних ділянок Інституту садівництва УААН та з промислових насаджень Київської області.

Зразки перевіряли на наявність антигенів ВМЯ за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), тест-системи фірми LOEWE.

Тотальну РНК виділяли з 100 мг рослинних тканин за допомогою кіта RNeasy Plant Mini kit ("Qiagen", Великобританія). ЗТ-ПЛР проводили за допомогою кіта one-step-RT-PCR ("Qiagen", Великобританія) з праймерами (комплементарними до ділянки гена капсидного білка): смисловий 5' ATCCGAGTGAACAGTCTATCCTCTAA та антисмисловий 5' GTAACCTCACTCGTTATCAGTACAА [4]. Постановку реакції (на один зразок) здійснювали за рекомендацією виробника, а саме: 14,5 мкл води, 5 мкл 5 × ПЛР-буферу, 1 мкл суміші нуклеотидів (dNTP), 1 мкл Q-розчину, 1 мкл суміші ферментів, 0,6 мкл смислового праймера, 0,6 мкл антисмислового праймера, 1,5 мкл тотальної РНК. Додавання всіх реагентів у епендорф проводили на холоді. Розмір продукту ампліфікації 262 п. о. Ампліфікацію виконували в такому режимі: зворотна транскрипція: 50 °С — 30 хв; 95 °С — 10 хв; ПЛР: 40 циклів — 94 °С — 30 с; 55 °С — 40 с; 72 °С — 1 хв 20 с; фінальна добудова 72 °С — 10 хв. Результати ампліфікації перевіряли за допомогою електрофорезу в агарозному гелі за допомогою транслюмінатора ("Bio-Rab", США) з використанням стандартних маркерів Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus ("Fermentas", США) з подальшим фотографуванням гелів в ультрафіолетовому світлі. Сиквенування очищених ампліфікованих фрагментів проводили на Applied Biosystems 3730x1 DNA Analyzer з використанням Big Dye terminators, version 3.1 ("Applied Biosystems", США). Ідентифікацію та порівняння отриманих послідовностей здійснювали за допомогою системи BLAST-аналізу (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Філогенетичний аналіз виконували за допомогою програми Mega 4 [5]. Філогенетичні дерева конструювали методом зв'язування найближчих сусідів (neighbor-joining, NJ) [6]. Для перевірки достовірності побудованих дерев застосовували бутстреп тест (bootstrep) з 100 бутстреп реплікаціями [7].

Результати дослідження та їх обговорення. При обстеженні насаджень яблуні в травні-червні 2008 р. на дослідних ділянках Інституту садівництва УААН та промислових насаджень яблуні Київської області на окремих рослинах (сорт Слава Переможцям, Пінова тощо) були виявлені симптоми, характерні для ВМЯ, у вигляді яскраво-жовтої мозаїки, плям, кілець (рис. 1). Симптоми виявлялися весною (травень) на перших молодих листках яблуні.

У відібраних з даних рослин зразках (листя, пелюстки) наявність ВМЯ інфекції було підтверджено за допомогою як імуноферментного аналізу, так і ЗТ-ПЛР. У результаті постановки ЗТ-ПЛР в агарозному гелі спостерігали утворення продуктів ампліфікації необхідної маси 262 bp (рис. 2).

Для визначення нуклеотидної послідовності фрагмента гена капсидного білка проводили сиквенування отриманих ПЛР ампліконів: амплікон-1 — сорт Слава Переможцям, амплікон-2 — Внучка, амплікон-3 — Пінова, амплікон-4 — Рубінове Дуки. Нуклеотидна послідов-



Рис. 1. Симптоми, викликані вірусом мозаїки яблуни на листках *Malus domestica* Borkh, сорт Слава Переможцям (промислові насадження Київської області)

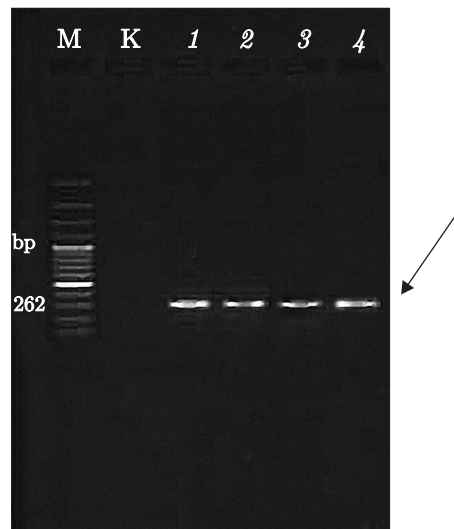


Рис. 2. Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР ВМЯ в агарозному гелі: 1 — Слава Переможцям, 2 — Внучка, 3 — Пінова, 4 — Рубінове Дуки; М — маркери, К — негативний контроль

ність фрагмента гена капсидного білка одного з українських ізолятів ВМЯ — ізолят з сорту Слава Переможцям була задепонована в Ген банк під номером FJ752493.

За результатами порівняння отриманих чотирьох ампліконів фрагмента гена капсидного білка ВМЯ між собою за допомогою програми BLAST, відсоток гомології між ампліконом-1 та ампліконом-2 становить 96%, амплікону-1 та амплікону-3 — 97%, а амплікону-1 та амплікону-4 — також 97%. Ці дані свідчать про високу спорідненість циркулюючих в Україні ізолятів ВМЯ та про їх належність до одного штаму.

Порівняння українських ізолятів ВМЯ з аналогічними послідовностями у Ген банку (табл. 1) показало відповідність ампліфікованих продуктів відомим послідовностям гена, які кодують капсидний білок ВМЯ.

Найвищий відсоток гомології з цими послідовностями становить 99% (номер доступу AY542543.1 [8]). Виявилось, що така висока гомологія існує з ізолятами з Чехії, що може пояснюватися близьким розташуванням наших країн та інтенсивним обміном посадкового

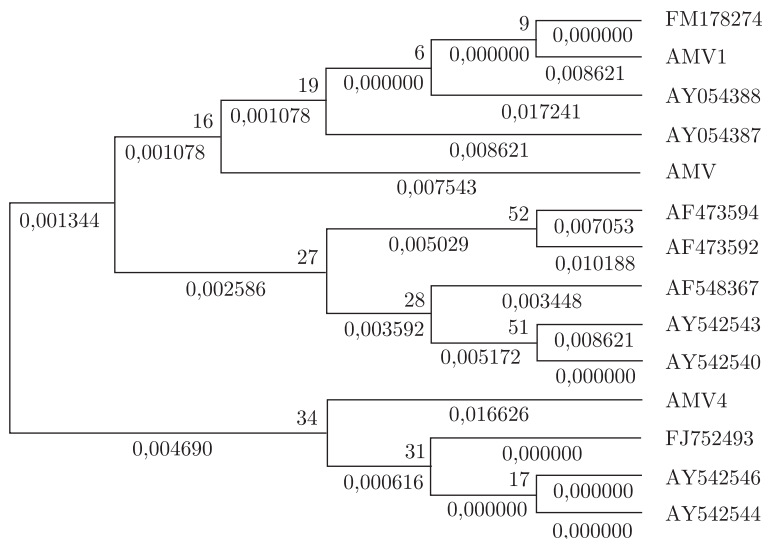


Рис. 3. Філогенетичні взаємовідносини українських ізолятів ВМЯ та відомих ізолятів ВМЯ в Ген банку. Філограма побудована за методом зв'язування найближчих сусідів, з 100 бутстреп реплікацій. Оптимальне дерево із сумарною довжиною ланцюга 0,11314655. AMV, AMV1, AMV4, FJ752493 — українські ізоляти ВМЯ

матеріалу і свідчити про поширення одних і тих самих ізолятів ВМЯ. Найменшу спорідненість — 92%, відмічено з австралійським ізолятом з хмелю (номер доступу AF473592.1 [9]). З цього виходить, що українські ізоляти ВМЯ не можна вважати окремим штамом даного вірусу, оскільки відсоток гомології з іншими відовими послідовностями досить високий, що можна пояснити низькою варіабельністю геному даного вірусу і відсутністю його штамового різноманіття.

Філогенетичні взаємовідносини українських ізолятів ВМЯ та ізолятів з Ген банку досліджені за допомогою комп'ютерної програми Mega 4. Як видно з рис. 3, філогенетичне дерево розбите на два основних кластера. Українські ізоляти ВМЯ входять до обох кластерів. Окремий підкласстер складають ізоляти ВМЯ хмелю.

Таким чином, визначено молекулярно-біологічні особливості українських ізолятів ВМЯ. Порівняння нуклеотидних послідовностей фрагмента гена капсидного білка українських

Таблиця 1. Нуклеотидна подібність (%) за геном капсидного білка ВМЯ з яблуні та інших господарів до українського ізоляту ВМЯ

Номер у Ген банку	Вірус	Господар	Країна	Подібність з українським ізолятом ВМЯ, %
FJ752493.1	АрMV	Яблуня	Україна	100
AY542543.1	АрMV	Яблуня	Чехія	99
AY542546.1	АрMV	Груша	Чехія	98
AY542544.1	АрMV	Груша	Чехія	97
FM178274.1	АрMV	Яблуня	Індія	96
AY542540.1	АрMV	Яблуня	Бельгія	99
AF548367.1	АрMV	Яблуня	Корея	94
AF473594.1	АрMV	Хміль	Австралія	93
AY054387.1	АрMV	Хміль	Чехія	93
AF473592.1	АрMV	Хміль	Австралія	92
AY054388.1	АрMV	Мигдаль	Італія	92

ізолятів ВМЯ показало високу гомологію досліджених ампліконів як між собою, так і з відомими послідовностями в Ген банку.

1. *Nemeth M.* Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit trees. – Budapest: Akademiai Kiado, 1986. – P. 256–269.
2. *Cembali T., Folwell R. J., Wandschneider P. et al.* Economic implications of a virus prevention program in deciduous tree fruits in the US // Crop Protection. – 2003. – **22**. – P. 1149–1156.
3. *Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J. et al.* Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses // The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. – P. 1162.
4. *Menzel W., Jelkmann W., Maiss E.* Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control // J. Virol. Methods. – 2002. – **99**, No 2. – P. 81–82.
5. *Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. and Evol. – 2007. – **24**. – P. 1596–1599.
6. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Ibid. – 1987. – **4**. – P. 406–425.
7. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. – 1985. – **39**. – P. 783–791.
8. *Petzik K.* Capsid protein sequence gene of Apple mosaic virus infecting pears // Eur. J. Plant Pathology. – 2005. – **111**. – P. 355–360.
9. *Crowle D. R., Pethybridge S. J., Leggett G. W. et al.* Diversity of the coat protein-coding region among Parvivirus isolates infecting hop in Australia // Plant Pathology. – 2003. – **52**. – P. 655–662.

Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 22.12.2009

A. V. Gospodaryk, I. G. Budzanivs'ka, D. K. Kundu, V. P. Polishchuk

Molecular biological properties of Ukrainian isolates of Apple mosaic virus isolated from apple (*Malus domestica* Borkh.)

As a result of the sequencing, nucleotide sequences of a coat protein gene of four Ukrainian isolates of Apple mosaic virus (ApMV) isolated from apple are established. The phylogenetic analysis of Ukrainian isolates of ApMV showed their high homology between themselves and with isolates deposited in the Genbank.