

KHOKHLOV A.M.

Slobozhanskiy State Agrarian University

Ukraine, 62341, Kharkov region., Dergachi district, p /Small Danilovka st. Academic one,

e-mail:zoovet@zoovet.kharkov.ua.

MICROEVOLUTION AND PROSPECTS OF SWINE GENOME USE IN SELECTION

Purpose. The study and use in the selection process the genetic methods based on the achievements of immune genetics, biochemical polymorphism and DNA technologies that allow to model and predict the processes of hybridization and breed formation in swine breeding are the main tasks of the investigation.

Methods. The morphological, immunogenetic, cytogenetic, biochemical and archaeological methods of investigation have been used when studying microevolution of swine from Neolithic period to up-to-date breed formation process.

Results. The biological rate of evolution at different stages of domestication of the *Sus* order, the sources of genetic mutation have been defined. **Conclusions.** The general characteristic of the swine genome creates the possibility to estimate microevolutional processes in the population of wild and domestic swines from another point of view, to focus more on the selection process of the creation of new lines, hybrids and breeds with high level of productivity.

Key words: swine, phenotype, gene, selection.

ЧИРКОВ С.Н., ИВАНОВ П.А., ШЕВЕЛЕВА А.А.

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Россия, 119991, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, 1/12, e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

ОБНАРУЖЕНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НОВОГО ШТАММА ВИРУСА ОСПЫ СЛИВЫ (PLUM POX VIRUS)

Вирус оспы сливы (ВОС, *Plum pox virus*, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) считается самым вредоносным вирусным патогеном косточковых культур. Вследствие большого экономического значения вызываемого им заболевания («шарки»), интенсивных молекулярно-биологических исследований и широкого использования в биотехнологических разработках, ВОС является одним из наиболее изученных вирусов растений [1].

Вирионы ВОС представляют собой нитевидные частицы длиной 750 нм и диаметром 15 нм, которые состоят из одной молекулы РНК положительной полярности длиной около 10 тыс. нуклеотидов и белка оболочки (БО) с мол. м. около 36 кДа. Геномная РНК бидирионна, содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области (NCR) длиной 146 и 217 нуклеотидов, вирусный белок, ковалентно связанный с 5'-концом молекулы РНК, и поли-А-последовательность на 3'-конце. В зараженных клетках РНК транслируется с образованием полипротеина, который нарезается вирусспецифическими протеазами на 10 функционально активных белков. N-конец БО экспонирован на поверхности вирусной частицы и является самой вариабельной частью молекулы. В нем локализовано большинство вирус- и штаммспецифичных эпитопов. Антигенные раз-

личия N-конца молекулы БО и вариабельность последовательности гена БО послужили основой для выделения 5 штаммов ВОС: Dideron (D), Marcus (M), Cherry (C), El Amag (EA) и Winona (W). Секвенирование других генов вируса позволило идентифицировать еще 2 рекомбинантных штамма ВОС. У штамма Rec 3'-концевая часть генома происходит от штамма M, а остальная – от штамма D в результате рекомбинации между этими штаммами в гене репликазы (NIb). Штамм T (Turkish) является продуктом рекомбинации штамма M с ВОС неясного происхождения в области генов НсPro и Р3. Штаммы различаются по эпидемиологическим свойствам, географическому распространению и патогенности для различных видов косточковых культур. Штаммы D, M и Rec распространены повсеместно, остальные встречаются сравнительно редко и/или являются эндемичными для определенных регионов [2 – 3].

ВОС способен заражать многие, если не все, растения косточковых культур, относящиеся к роду *Prunus* [4, 5]. Вишня (*Prunus cerasus*) и черешня (*P. avium*) считались устойчивыми к этому вирусу, пока в конце прошлого века ВОС не был обнаружен на вишне в Молдавии [6] и черешне в Италии [7]. С тех пор штамм PPV-C считали единственным, который может систем-

но заражать вишню. Другие штаммы ВОС на вишне и черешне до недавнего времени выявлены не были.

В 2012 году при мониторинге ВОС в декоративных насаждениях в г. Москве нами были обнаружены деревья вишни с симптомами кольцевой пятнистости на листьях, напоминающими симптомы ВОС. В соответствии с их локализацией, образцы были обозначены Кр8-1, Кр8-1U, Кр8-2U, Кр8-2D, Fl-1, Fl-2, Fl-3, Pul-1 и Pul-DS. Экстракты из листьев этих растений давали положительную реакцию в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа с поликлональными антителами, выполненным с помощью ELISA reagent set SRA 31505 (Agdia, США). В то же время, анализ этих экстрактов в Triple-antibody sandwich (TAS)-ELISA с помощью наборов K10B (Agritest, Италия), основанных на применении моноклональных антител 5B-IVIA к универсальному вирус-специфическому эпитопу ВОС [8], показал отсутствие реакции в анализируемых образцах. Анализ тех же экстрактов методом иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ИСОТ-ПЦР) с 2 парами универсальных праймеров, специфичных к 3'-NCR [9] и к 3'-терминальному участку гена БО [10], показал образование продуктов ПЦР ожидаемой длины 220 и 243 пн, соответственно, что подтверждало зараженность этих образцов ВОС.

Штамм выявленных изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к известным штаммам ВОС [11 – 14]. Ни с одним из образцов не было обнаружено положительной реакции, в том числе и с праймерами к штамму PPV-C. Можно было предположить, что выявленные изоляты являются атипичными представителями штамма PPV-C или принадлежат к неизвестному штамму ВОС.

Секвенирование геномной РНК вируса или гена БО позволяет надежно идентифицировать штамм определенного изолята ВОС. Последовательности генов БО были амплифицированы методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных к 3'-NCR и к 3'-концу гена N1b PPV-C, секвенированы в фирме Евrogen (г. Москва) и депонированы в базе данных GenBank (JX472432 – JX472440).

Установлено, что ген БО атипичных вишневых изолятов состоит из 996 нуклеотидов и кодирует белок, состоящий из 332 аминокислот. Сравнение последовательностей гена БО атипичных изолятов выявило их сходство внутри группы на 99,2 – 100%. Большинство из немногих нуклеотидных замен оказались молчащими.

В то же время, обнаружена высокая степень дивергенции атипичных изолятов от известных штаммов ВОС. Уровень сходства варьировал от 62,1% при сравнении со штаммом PPV-EA до 85,2% при сравнении со штаммом PPV-C.

Для определения таксономического положения этих изолятов было построено филогенетическое дерево, основанное на сравнении генов БО атипичных изолятов и ряда изолятов, принадлежащих к другим штаммам вируса. Их нуклеотидные последовательности были взяты из базы данных GenBank. Для построения дерева использовали алгоритм Neighbor-Joining, встроенный в программу MEGA5 [15], с бутстрэп-анализом из 1000 случайных выборок. Результаты анализа (Рис. 1) показали, что выявленные нами изоляты («atypical isolates») группируются отдельно от всех известных штаммов, что указывает на их принадлежность к неизвестному ранее штамму ВОС, и объясняет отрицательный результат ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к известным штаммам. Очевидно, что атипичные изоляты и представители штамма PPV-C дивергировали от общего предка и представляют собой две независимые эволюционные линии.

Во время выполнения нашей работы появилось сообщение Glasa et al. [16] об обнаружении необычных изолятов ВОС на вишне в Самарской и Саратовской областях РФ. Анализ последовательностей их геномов показал, что они только на 70 – 80% идентичны изолятам, принадлежащим к известным штаммам ВОС. Эту группу изолятов было предложено выделить в отдельный штамм PPV-CR (Cherry Russian).

Были разработаны праймеры для специфического определения изолятов, относящихся к новому штамму. При их использовании для идентификации обнаруженных нами вишневых изолятов образовывался продукт ПЦР ожидаемого размера 427 пн во всех 9 образцах. Результаты ОТ-ПЦР показывали, что атипичные вишневые изоляты являются представителям нового штамма PPV-CR.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей N-конца БО атипичных изолятов и 3 изолятов, обнаруженных Glasa et al. [16] (Ru-17sc, RU-18sc и Ru-30sc) представлено на рис. 2. Это сравнение показывает, что изоляты, найденные в Москве, на 96,6 – 98,3% идентичны изолятам, обнаруженным в Самарской и Саратовской областях, что является еще одним доказательством принадлежности всех их к штамму PPV-CR и указывает на высокую генетическую стабильность нового штамма.

В универсальном эпитопе всех изолятов, принадлежащих к штамму PPV-CR, аспаргиновая кислота (D) в позиции 96 заменена на глутаминовую кислоту (E) (Рис. 2). Эта замена может негативно сказываться на взаимодействии моно-

клональных антител 5B-IVIA с универсальным эпитопом [8] и объяснять отрицательные реакции при определении этих изолятов в TAS-ELISA.

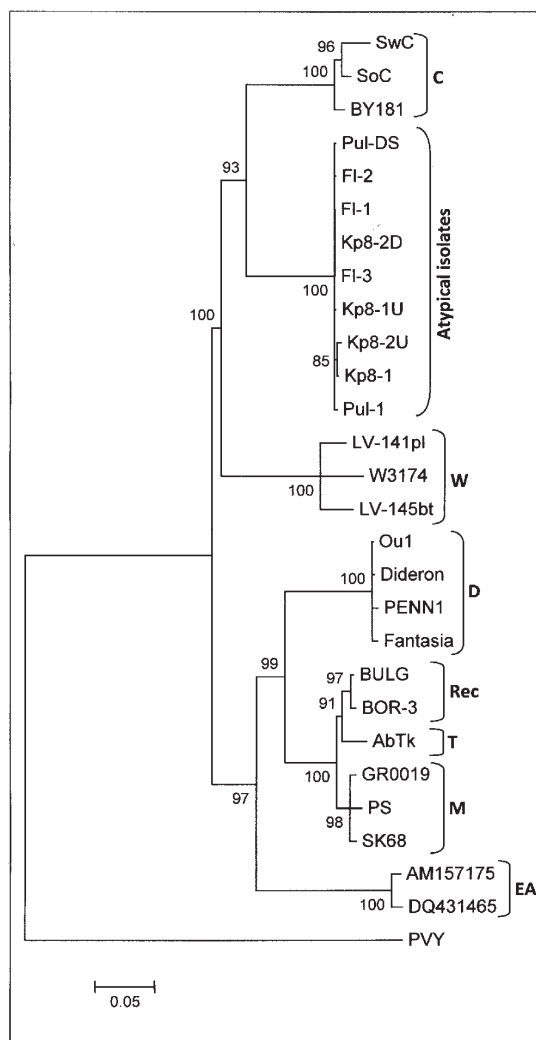


Рис. 1. Филогенетический анализ 9 атипичных вишневых изолятов и репрезентативных изолятов ВОС, представляющих известные штаммы вируса, на основе сравнения генов БО. Значения бутстрэп-анализа (только выше 70%) указаны на ветвях дерева. Масштабная черта показывает число замен на 1 нуклеотид. Номера последовательностей, извлеченных из GenBank: EU734794 (AbTk), GU461889 (BULG), AY028309 (BOR-3), FM955843 (GR0019), AJ243957 (PS), M92280 (SK68), AY184478 (SoC), Y09851 (SwC), HQ840518 (BY181), AY912055 (W3174), HQ670746 (LV-141pl), HQ670748 (LV-145bt), AY912056 (Fantasia), AF401295 (PENN-1), X16415 (Dideron). Для изолятов штамма PPV-EA номера показаны на ветвях дерева. Последовательность гена БО потивируса Y картофеля (PVY) использована в качестве филогенетической аутгруппы (X12456)

Таким образом, в растениях вишни обнаружены изоляты ВОС, относящиеся к новому штамму PPV-CR. Места находок этих изолятов отстоят один от другого на сотни километров, что может свидетельствовать о широком распространении нового штамма на территории Европейской России. Полученные результаты впервые показывают, что вишня может зара-

жаться не только PPV-C, но и другими штаммами ВОС. В заключение следует отметить, что предпринятые в последние годы исследования генетического разнообразия ВОС на постсоветском пространстве привели к открытию многих уникальных изолятов [13, 14, 17–19], что существенно расширяет и изменяет представления о биологическом разнообразии этого вируса.

1 10 20 30 40 50 60
 Fl-1 ANEGGDDDDVTLVDAGKSTVTTAATTPITTS AQLPPPVPQLRSTTPMF EIFTPTATTQPT
 Fl-2
 Fl-3
 Kp8-1
 Kp8-1U
 Kp8-2D
 Kp8-2U I.....A.....
 Pul-DS
 Pul-1
 RU-17sc ...N.....S.....
 RU-18sc ...N.....
 RU-30sc ...NN.....

* * **

70 80 90 100 110
 Fl-1 IKPVTSPMTSPFSYGVIGNQNVAPSSSNALANTRK **ERD**V DAGTVGTF SVPR LKAMTSKL
 Fl-2
 Fl-3
 Kp8-1
 Kp8-1U
 Kp8-2D
 Kp8-2U
 Pul-DS
 Pul-1
 RU-17sc .Q.....
 RU-18scT.....
 RU-30scP.....

* * **

Рис. 2. Множественное выравнивание N-терминальных аминокислотных последовательностей БО атипичных вишневых изолятов, обнаруженных в Москве, в Саратовской и Самарской областях. Выравнивание начинается с первой аминокислоты БО. Последовательность универсального эпитопа затенена

Литература

- Scholthof K.-B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12. – P. 938–954.
- Garcia J.A., Cambra M. Plum pox virus and sharka disease // Plant Viruses. – 2007. – Vol. 1. – P. 69–79.
- Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. Sharka: The Past, the Present and the Future // Viruses. – 2012. – Vol. 4. – P. 2853–2901.
- James D., Thompson D. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: ornamental and wild *Prunus* species // EPPO Bull. – 2006. – Vol. 36. – P. 222–224.
- Llácer G., Cambra M. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: fruiting *Prunus* species // EPPO Bull. – 2006. – Vol. 36. – P. 219–221.
- Kalashyan Y.A., Bilkey N.D., Verderevskaya T.D., Rubina E.V. Plum pox potyvirus on sour cherry in Moldavia // EPPO Bull. – 1994. – Vol. 24. – P. 645–650.
- Crescenzi A., Nuzzaci M., Levy L., Piazzolla P., Hadidi A. Plum pox virus (PPV) in sweet cherry // Acta Hort. – 1995. – Vol. 386. – P. 219–225.
- Candresse T., Saenz P., Garcia J. A., Boscia D., Navratil M., Gorris M.T., Cambra M. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein // Phytopathology. – 2011. – Vol. 101. – P. 611–619.
- Levy L., Hadidi A. A. Simple and rapid method for processing tissue infected with Plum pox potyvirus for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays // EPPO Bull. – 1994. – Vol. 24. – P. 595–604.
- Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox virus* // EPPO Bull. – 2004. – Vol. 34. – P. 247–256.
- Nemchinov L., Hadidi A. Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup // J. Virol. Meth. – 1998. – Vol. 70. – P. 231–234.

12. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // *J. Virol. Meth.* – 1997. – Vol. 68. – P. 127–137.
13. James D., Varga A. Preliminary molecular characterization of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain // *Acta Hortic.* – 2004. – Vol. 657. – P. 177–182.
14. Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczyk L., Candresse T. Sequence Variability, Recombination Analysis and Specific Detection of the W Strain of Plum pox virus // *Phytopathology.* – 2011. – Vol. 101. – P. 980–985.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
16. Glasa M., Prichodko Y., Zhivaeva T., Schneider Y., Predajna L., Subr Z., Candresse T. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. Book of Abstracts of 22th International Conference on Virus and Other Transmissible Disease of Fruit Crops. June 3–8, 2012. Rome, Italy. – 2012. – P. 37.
17. Чирков С.Н., Бызова Н.А., Шевелева А.А., Митрофанова И.В., Приходько Ю.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Испытания отечественных иммуно хроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // *Сельскохозяйств. Биол.* – 2012. – №1. – С. 110–116.
18. Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S. Occurrence and genetic diversity of Winona-like Plum pox virus isolates in Russia // *Plant Dis.* – 2012. – Vol. 96. – P. 1135–1142.
19. Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е.Е. Изучение штаммов вируса шарки слив в Российской Федерации // *Защита и карантин растений.* – 2011. – №11. – С. 29–32.

CHIRKOV S.N., IVANOV P.A., SHEVELEVA A.A.

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University
Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory 1/12, e-mail: s-chirkov1@yandex.ru*

DISCOVERY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A NOVEL PLUM POX VIRUS STRAIN

Aim. Atypical isolates of Plum pox virus (PPV) discovered in naturally infected sour cherry in urban ornamental plantings in Moscow, Russia have been studied. **Methods.** The isolates were detected by polyclonal double antibody sandwich ELISA and RT-PCR using universal primers specific to 3'-non-coding and to coat protein (CP) genome regions but failed to be recognized by triple antibody sandwich ELISA with the universal monoclonal antibody 5B and by RT-PCR using primers specific to the conventional PPV strains. **Results.** The CP gene sequence analysis of 9 isolates revealed the 99.2 – 100% of within-group identity and 62 - 85% identity with the conventional PPV strains. **Conclusion.** Phylogenetic analysis and alignment of the N-terminal CP aa sequences showed that the atypical isolates represent a group distinct from the known PPV strains and belong to a new tentative PPV strain CR.

Key words: *Plum pox virus*, sour cherry, phylogenetic analysis, PPV strain CR.

ШПИЛЬЧИН В.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

*Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net*

ЗАСТОСУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ IRAP ТА РАМАР ДЛЯ ПОШУКУ ПОЛІМОРФІЗМУ СЕРЕД АМФІДИПЛОЇДІВ, НЕСТАБІЛЬНИХ ЗА ОЗНАКОЮ ВОСКОВА ОСУГА

Штучний гексаплоїд Авротика має геном ААВВТТ, де частина ААВВ від м'якої пшениці, ТТ — геном диплоїдного егілопса *Aegilops mutica*. Амфідиплоїд Міоза (ААВВМ^tМ^t) об'єднує геноми твердої пшениці *Mutiko italicum* (ААВВ) та диплоїда *Ae. comosa* (М^tМ^t). Ініціальні амфідиплоїди не мали воскової осуги на листках та колосі, тобто були зеленими. За

кілька генерацій серед зелених рослин стали з'являтися рослини з восковою осугою, блакитні, які не відрізнялись від зеленої форми за жодною з інших ознак морфології рослини [1]. Блакитні форми амфідиплоїдів є константними, зелені у кожній генерації вищеплюють блакитні рослини. Можливість перезапилення та розщеплення гетерозигот повністю відкидається. Ре-