

Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик*Институт плодородства, аг. Самохваловичи, Республика Беларусь***МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА ВИРУСА
КРАСНОЙ КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ГОЛУБИКИ**

Вирус красной кольцевой пятнистости голубики (BRRV) является одним из вредоносных вирусов брусничных культур и, в соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO), подлежит контролю и не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала *Vaccinium* spp. Отсутствие данных о белорусских изолятах BRRV определило необходимость проведения детального анализа данного вируса с использованием PCR-диагностики, секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей вируса.

В результате впервые охарактеризован на молекулярном уровне изолят BRRV из Беларуси (BRRV-BY1). В ходе работы амплифицирован и секвенирован фрагмент гена активатора транскрипции вируса. Полученная нуклеотидная последовательность помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank), где ей присвоен идентификационный номер LN998983. Филогенетический анализ последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят наиболее родственен изолятам вируса из США. Корреляции между кластерированием изолятов и их географическим происхождением не обнаружено.

Ключевые слова: вирус красной кольцевой пятнистости голубики, PCR, ген активатора транскрипции, изолят, филогенетический анализ, Беларусь.

T. N. Bazhydai, N. V. Kukharchyk*Institute for Fruit Growing, Samohvalovichi, Republic of Belarus***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS ISOLATE**

The fragment of BRRV isolate from Belarus (BRRV-BY1) was sequenced for the first time and nucleotide sequence of this isolate was deposited in GenBank with the accession No. LN998983. Sequence analysis revealed that the Belarusian isolate shared 94.1–99.3 % identity with 18 isolates of the virus available in GenBank. BRRV isolate from Belarus was mostly closely related to those from the USA (accession Nos JF917083 and JF917082) as they shared 99.3 % nucleotide identity. Phylogenetic analysis showed that clustering of investigated isolates didn't depend on their geographical origin.

Keywords: Blueberry red ringspot virus, PCR, transcriptional activator gene, isolate, phylogenetic analysis, Belarus.

Введение. Вирус красной кольцевой пятнистости голубики (*Blueberry red ringspot virus*, BRRV) до 2002 г. относили к роду *Caulimovirus*, затем он был реклассифицирован и отнесен к роду *Soymovirus* (сем. *Caulimoviridae*) [1]. Частицы изометрические, около 42–46 нм в диаметре. Геном вируса представлен в виде двухцепочечной ДНК, состоящей из 8265 п. н. [2].

Симптомы заболевания появляются в конце лета на побегах и на адаксиальной стороне листьев (иногда на плодах) в виде красных колец или пятен от 2 до 6 мм в диаметре, осенний вид листья приобретают на несколько недель раньше, чем у здоровых растений [3, 4]. Отмечается снижение урожайности (согласно литературным данным, в Мичигане потеря урожая составила 25 %) [4, 5].

Предполагаемые векторы переноса – мучнистые червецы (*Dysmicoccus* spp.) [5, 6].

Поражаемые виды – *Vaccinium corymbosum* L., *V. australe* Small., *V. ashei* J. M. Reade [3, 6].

Подобному заболеванию подвергались также растения клюквы крупноплодной (*V. macrocarpon* Ait.): в период плодоношения отмечались белесые кольца на деформированных плодах, осенью – зеленые кольца на краснеющих листьях [3].

Основным методом диагностики данного ДНК-содержащего вируса *Vaccinium* spp. в настоящее время является полимеразная цепная реакция (PCR) [3–5, 7, 8]. Для BRRV были разработаны

антитела [3], однако использование серологических методов для диагностики данного вируса оказалось ненадежным [5].

Впервые о присутствии BRRV в растениях голубики сообщалось в США, а в настоящее время данное заболевание зарегистрировано и на территории Европы (Польша, Италия, Чехия, Словения) [8–11]. В соответствии с нормативными документами Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (EPPO) BRRV подлежит контролю и не допускается при производстве сертифицированного посадочного материала *Vaccinium* spp. [12].

Знание о локализации консервативных и вариабельных областей внутри вирусного генома является важным для диагностики вируса и разработки современных методов контроля вирусной инфекции.

Цель работы – установить нуклеотидную последовательность фрагмента гена активатора транскрипции вируса красной кольцевой пятнистости голубики, выделенного из голубики высококорослой в Беларуси, и сравнить полученные результаты с ранее опубликованными данными о последовательностях исследуемого вируса.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства». Материалом для исследований служили листья голубики сорта *Bluetta* с характерными симптомами BRRV. Наличие вируса в растительной ткани определяли методом PCR.

Для выделения ДНК использовали коммерческий набор NucleoSpin® Plant II (MACHEREY-NAGEL, Германия).

Растительный материал (50 мг) растирали пестиком в ступке с жидким азотом до получения пудры. К измельченному материалу добавляли 400 мкл лизирующего буфера (PL1), 10 мкл RNase A и продолжали растирать. Затем добавляли еще 100 мкл буфера PL1, растирали, после чего смесь переносили в 2-миллилитровые микроцентрифужные пробирки, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad, США) и инкубировали 10 мин при 65 °С. Для удаления остатков нелизированных клеток лизат переносили на фильтрационные колонки (в 2-миллилитровых микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. К очищенному лизату добавляли 450 мкл буфера РС, интенсивно перемешивали при помощи Vortexer (Bio-Rad, США). Затем смесь переносили на поверхность связывающих колонок (в 2-миллилитровых микроцентрифужных пробирках) и центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин для связывания ДНК. Далее осуществляли трехкратное промывание мембраны связывающих колонок: 1) добавляли 400 мкл буфера PW1, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 2) добавляли 700 мкл буфера PW2, центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин; 3) добавляли 200 мкл буфера PW2, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин. Дополнительный этап центрифугирования (1 мин при 10 000 об/мин) использовали для удаления остатков промывающего раствора с мембран колонок. Элюирование ДНК проводили путем добавления 50 мкл буфера РЕ (разогретого до 65 °С), инкубирования при 65 °С в течение 5 мин и центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 1 мин.

Для проведения PCR использовали реакционные компоненты Thermo Scientific (Литва). Реакционная смесь объемом 12,5 мкл содержала milliQ воду, 1,25 мкл 10×Taq-буфера, 0,75 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0,25 мкл смеси dNTP (10 мМ), по 0,25 мкл каждого праймера (RRSV3 – ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA, RRSV4 – TCCGAAAAATAGATAGTGTTCAGC [5]), 0,125 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 0,5 мкл ДНК-матрицы.

PCR проводили на амплификаторе iCycler® 3.032 (Bio-Rad, США) при следующих заданных параметрах: 1 цикл: при 95 °С – 4 мин; 35 циклов: при 95 °С – 30 с, при 57 °С – 45 с, при 72 °С – 45 с; 1 цикл: при 72 °С – 5 мин. Размер ожидаемого PCR продукта – 549 п. н.

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1 %-ном агарозном геле и 1×TAE-буфере (Bio-Rad, США). Результаты электрофореза документировали с помощью аппаратного обеспечения Gel Doc™ EQ System (Bio-Rad, США) и пакета программ Quantity One® (Bio-Rad, США).

Амплифицированные фрагменты вирусных геномов передавали для секвенирования в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси». Анализы по определению нуклеотидных последовательностей методом секвенирования проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США).

Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного пакета MEGA 6.0, множественное выравнивание последовательностей – при помощи Clustal W алгоритма. Филогенетические деревья были построены методом Neighbour-Joining. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей, выявленные бутстреп (bootstrap) анализом (1000 псевдореплик), который позволяет оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного дерева. В случае бутстреп-поддержки ниже 70 % статистическая надежность данного узла считалась недостоверной. Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее пяти заменам на каждые 1000 нуклеотидов.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований амплифицирован фрагмент (549 п. н.) гена активатора транскрипции BRRV из голубики сорта Bluetta (рис. 1). После секвенирования (в прямом направлении) получены данные о нуклеотидной последовательности участка генома белорусского изолята BRRV (BRRV-BY1). Нуклеотидная последовательность была помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank) с присвоением идентификационного номера LN998983.

Анализ последовательностей гена активатора транскрипции BRRV проведен с использованием полученной нами и депонированных в GenBank базе данных последовательностей BRRV (см. таблицу).

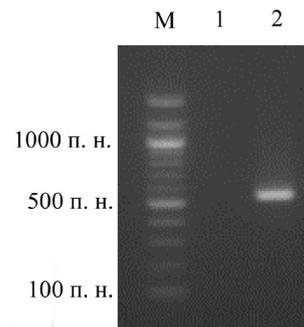


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации при PCR-диагностике BRRV с праймерами RRSV3/RRSV4: М – маркер 100 bp DNA Ladder (BioLabs, США); 1 – отрицательный контроль; 2 – ДНК из листьев голубики сорта Bluetta

Fig. 1. Agarose gel analysis of BRRV amplicon obtained by PCR with the primer set RRSV3/RRSV4: M – 100 bp DNA Ladder (BioLabs, USA); 1 – negative control; 2 – DNA from leaves of blueberry cv. Bluetta

Изоляты BRRV, нуклеотидные последовательности которых использованы для филогенетического анализа

Nucleotide sequences of BRRV isolates used for phylogenetic analysis

Изолят вируса	Растение, из которого выделен изолят	Страна происхождения	Номер в GenBank
BRRV-BY1	<i>Vaccinium corymbosum</i> (Bluetta)	Беларусь	LN998983
UF1583	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Scintilla)	США	JF917083
UF1585	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917082
UF1586	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917085
UF1584	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917084.1
UF1587	<i>V. corymbosum</i> hybrid (Star)	США	JF917081
BRRV	<i>V. corymbosum</i> (Coville, Blueray)	США	AF404509
Darrow 5	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Чехия	HM159264
Coville 546	<i>V. corymbosum</i> (Coville)	Словения	JF421559
BRRSV24	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JN205460
BRRSV03	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303673
BRRSV22	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JF303681
BRRSV20	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303679
BRRSV13	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303675
BRRSV24	<i>V. corymbosum</i> (Herbert)	Польша	JF303682
BRRSV16	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303677
BRRSV15	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303676
BRRSV21	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303680
BRRSV12	<i>V. corymbosum</i> (Darrow)	Польша	JF303674

Сравнение нуклеотидной последовательности выделенного нами изолята с последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank, показало, что изоляты имели высокий уровень идентичности (94,1–99,3 %).

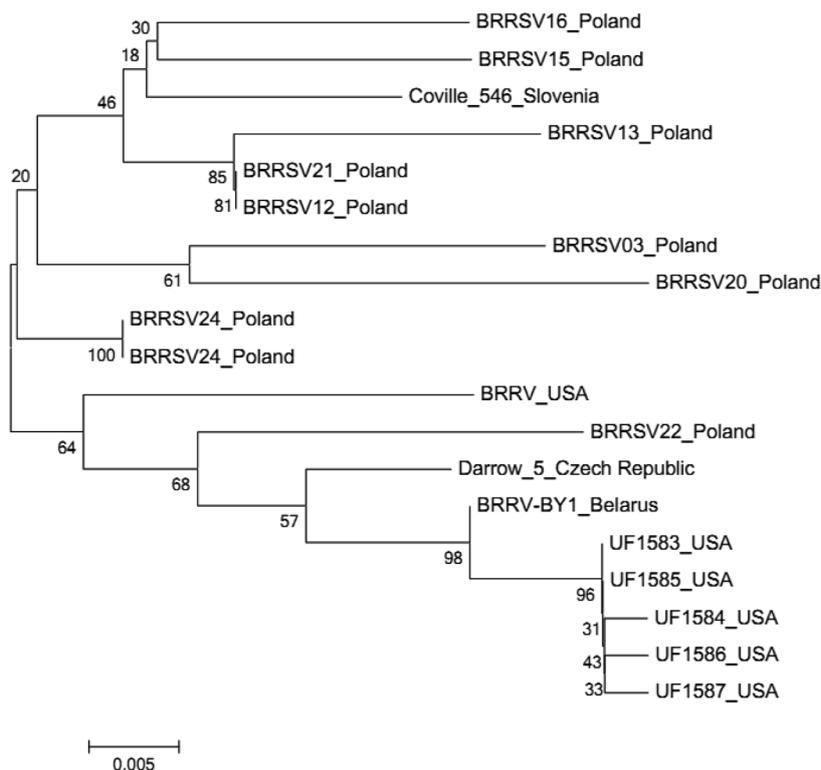


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей участка генома BRRV различных изолятов

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using the Neighbour-Joining algorithm based on comparison of nucleotide sequences of portion of the genome BRRV isolates

Наиболее генетически близкими к белорусскому изоляту были американские изоляты, выделенные из сортов южной высокорослой голубики Star и Scintilla (GenBank, № JF917083, JF917082), показавшие 99,3 % идентичности и отличающиеся от изолята из Беларуси 3 нуклеотидными заменами из 416 нуклеотидов анализируемой последовательности. Наиболее генетически далеким от белорусского изолята был польский изолят вируса, выделенный из сорта голубики Darrow (GenBank, № JF303679), показавший 94,1 % идентичности и отличающийся от изолята из Беларуси 24 нуклеотидами.

Сравнение аминокислотных последовательностей показало высокий уровень консервативности гена, кодирующего активатор транскрипции вируса. Наибольшее количество аминокислотных отличий – 8 (из 138 анализируемых аминокислот кодирующего гена).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят вместе с группой изолятов из США (UF1583, UF1585, UF1586, UF1584, UF1587) образовали один кластер (98 % бутстреп-поддержки) (рис. 2).

Часть изолятов из Польши образовывали два отдельных кластера с бутстреп-поддержкой 85 и 100 % соответственно. Остальные изоляты располагались отдельно. Корреляции между группированием изолятов вируса и их географическим происхождением не обнаружено. Это явление, вероятно, объясняется тем, что вариабельность гена активатора транскрипции вируса BRRV может зависеть не столько от географического происхождения, сколько от видовой принадлежности растения-хозяина. Однако для подтверждения или опровержения данной гипотезы необходимо наличие данных о нуклеотидных последовательностях исследуемого гена у изолятов BRRV, выделенных из других видов растений, которые в настоящее время не представлены в базе данных GenBank.

Невысокая вариабельность изолятов BRRV может быть также следствием вегетативного размножения растений голубики. В таком случае возможно тиражирование нескольких или только одного изолята вируса вместе с растениями и его распространения с растительным материалом.

Заклучение. Впервые в результате молекулярно-генетических исследований секвенирован участок генома изолята BRRV из Беларуси (BRRV-BY1). Полученная нуклеотидная последовательность помещена в международную базу данных (EMBL/GenBank), где ей присвоен идентификационный номер LN998983.

При сравнении нуклеотидной последовательности белорусского изолята с последовательностями, представленными в базе данных GenBank, установлено, что изоляты имеют высокий уровень идентичности (94,1–99,3 %). Филогенетический анализ последовательностей участка генома BRRV показал, что белорусский изолят группируется с изолятами вируса из США. Корреляции между кластеризацией изолятов и их географическим происхождением не обнаружено.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект Б15М-031).

Acknowledgement

Work supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (Project no. Б15М-031).

Список использованных источников

1. Cloning, sequencing and promoter identification of Blueberry red ringspot virus, a member of the family Caulimoviridae with similarities to the “Soybean chlorotic mottle-like” genus / B. M. Glasheen [et al.] // *Archives of Virology*. – 2002. – Vol. 147. – P. 2169–2186.
2. Kalinowska, E. Molecular characterization of polish blueberry red ringspot virus isolate / E. Kalinowska, E. Paduch-Cichal, M. Chodorska // *Virus Genes*. – 2012. – Vol. 44. – P. 309–311.
3. Emerging and reemerging virus diseases of blueberry and cranberry / R. R. Martin [et al.] // *Acta Horticulturae*. – 2009. – Vol. 810. – P. 299–304.
4. Martin, R. R. New and emerging viruses of blueberry and cranberry / R. R. Martin, J. J. Polashock, I. E. Tzanetakis // *Viruses*. – 2012. – Vol. 4, N 11. – P. 2831–2852.
5. Polashock, J. J. Molecular detection and discrimination of Blueberry red ringspot virus strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry / J. J. Polashock, M. K. Ehlenfeldt, J. A. Crouch // *Plant Dis.* – 2009. – Vol. 93, N 7. – P. 727–733.
6. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of small fruit germplasm / ed. by M. Diekmann, E. A. Frison, T. Putter; in collaboration with the Small Fruit Virus Working Group of the International Society for Horticultural Science. – Rome: Food and Agriculture of the United Nations; International Plant Genetic Resources Institute, 1994. – 124 p.
7. Cline, W. O. Blueberry red ringspot observations and findings in North Carolina / W. O. Cline, J. R. Ballington, J. J. Polashock // *Acta Horticulturae*. – 2009. – Vol. 810. – P. 305–312.
8. Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique / E. Paduch-Cichal [et al.] // *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. – 2011. – Vol. 10, N 4. – P. 201–215.
9. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland / E. Kalinowska [et al.] // *J. of Plant Pathol.* – 2011. – Vol. 93, N 4. – P. 73.
10. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the Czech Republic / J. Pribylova [et al.] // *Plant Dis.* – 2010. – Vol. 94, N 8. – P. 1071.
11. Plesko, I. M. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia / I. M. Plesko, M. V. Marn, D. Koron // *Julius-Kuhn-Archives*. – 2010. – Vol. 427. – P. 204–205.
12. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp.: EPPO Standards PM 4/18 (1) // *Bull. OEPP/EPPO*. – 1997. – Vol. 27. – P. 195–204.

References

1. Glasheen B. M., Polashock J. J., Lawrence D. M., Gillett J. M., Ramsdell D. C., Vorsa N., Hillman B. I. Cloning, sequencing and promoter identification of Blueberry red ringspot virus, a member of the family Caulimoviridae with similarities to the “Soybean chlorotic mottle-like” genus. *Archives of Virology*, 2002, vol. 147, pp. 2169–2186. doi: 10.1007/s00705-002-0866-7.
2. Kalinowska E., Paduch-Cichal E., Chodorska M. Molecular characterization of polish blueberry red ringspot virus isolate. *Virus Genes*, 2012, vol. 44, pp. 309–311. doi: 10.1007/s11262-011-0679-4.
3. Martin R. R., Tzanetakis I. E., Caruso F. L., Polashock J. J. Emerging and reemerging virus diseases of blueberry and cranberry. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 810, pp. 299–304. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.810.38.
4. Martin R. R., Polashock J. J., Tzanetakis I. E. New and emerging viruses of blueberry and cranberry. *Viruses*, 2012, vol. 4, no. 11, pp. 2831–2852. doi: 10.3390/v4112831.
5. Polashock J. J., Ehlenfeldt M. K., Crouch J. A. Molecular detection and discrimination of Blueberry red ringspot virus strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. *Plant Disease*, 2009, vol. 93, no. 7, pp. 727–733. doi: 10.1094/PDIS-93-7-0727.
6. FAO/IPGRI Technical guidelines for the safe movement of small fruit germplasm, in Diekmann M., Frison E., Putter T. (ed.), in collaboration with the Small Fruit Virus Working Group of the International Society for Horticultural Science. Rome, Food and Agriculture of the United Nations, International Plant Genetic Resources Institute, 1994, 124 p.

7. Cline W. O., Ballington J. R., Polashock J. J. Blueberry red ringspot observations and findings in North Carolina. *Acta Horticulturae*, 2009, vol. 810, pp. 305–312. doi: 10.17660/ActaHortic.2009.810.39.

8. Paduch-Cichal E., Kalinowska E., Chodorska M., Sala-Rejczak K., Nowak B. Detection and identification of viruses of highbush blueberry and cranberry using serological ELISA test and PCR technique. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 2011, vol. 10, no. 4, pp. 201–215.

9. Kalinowska E., Paduch-Cichal E., Chodorska M., Sala-Rejczak K. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland. *Journal of Plant Pathology*, 2011, vol. 93, no. 4, pp. 73. doi: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v93i4.2381>.

10. Pribylova J., Spak J., Kubelkova D., Petrzik K. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the Czech Republic. *Plant Disease*, 2010, vol. 94, no. 8, pp. 1071. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1071B>.

11. Plesko I. M., Marn M. V., Koron D. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia. *Julius-Kuhn-Archives*, 2010, vol. 427, pp. 204–205.

12. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Vaccinium* spp.: EPPO Standards PM 4/18 (1). *Bulletin OEPP/EPPO*, 1997, vol. 27, pp. 195–204.

Информация об авторах

Божидай Татьяна Николаевна – науч. сотрудник. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский р-н). E-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru.

Кухарчик Наталья Валерьевна – д-р с.-х. наук, доцент, заведующий отделом. Институт плодородства (ул. Ковалева, 2, 223013, аг. Самохваловичи, Минский р-н). E-mail: kychnataly@rambler.ru.

Для цитирования

Божидай, Т. Н. Молекулярная характеристика изолята вируса красной кольцевой пятнистости голубики / Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 2. – С. 27–32.

Information about the authors

Bazhydai Tatsiana Nikolaevna – Scientific researcher. Institute for Fruit Growing (2, Kovaleva Str., 223013, Samochvalovichi, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: tanya_bozhidaj@mail.ru.

Kukharchyk Natallia Valer'evna – D. Sc. (Agricult.), Assistant Professor, Head of the Department. Institute for Fruit Growing (2, Kovaleva Str., 223013, Samochvalovichi, Minsk region, Republic of Belarus). E-mail: kychnataly@rambler.ru.

For citation

Bazhydai T. N., Kukharchyk N. V. Molecular characterization of *Blueberry red ringspot virus* isolate. *Vesti Natsy-anal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], 2017, no. 2, pp. 27–32.