

УДК 634.72:578.862

Е. В. КОЛБАНОВА, Н. Н. ВОЛОСЕВИЧ, Н. В. КУХАРЧИК

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТА ВИРУСА РЕВЕРСИИ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*BLACKCURRANT REVERSION VIRUS*)

Институт плодородства, аг. Самохваловичи, e-mail: belhort@it.org.by

(Поступила в редакцию 27.02.2014)

Введение. Вирус реверсии смородины черной (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) относится к роду *Nepovirus* и является возбудителем серьезного заболевания смородины [1, 2]. Вирус распространен в странах, где выращивают растения смородины черной (*Ribes nigrum*), и переносится почковым клещом *Cecidophyopsis ribis* [3]. Типичными симптомами реверсии смородины являются изменение формы листовой пластинки, уменьшение опушенности побегов и усиление окраски цветковых почек. Большинство промышленных сортов смородины черной подвержены заражению и незначительно различаются по степени развития симптомов. Потери продуктивности смородины восприимчивых к вирусу сортов могут составить 100 %.

Геном вируса BRV представлен двумя молекулами РНК: РНК-1 и РНК-2 длиной 7700 и 6400 п.н. соответственно [1, 3]. РНК-1 содержит единственную рамку считывания, кодирующую кофактор вирусной протеазы (CoPro), белок, содержащий нуклеотид-связывающий участок (NTBM), цистеиновую протеазу (CysPro) и РНК-зависимую РНК полимеразу (RdRp). РНК-2 вируса кодирует белки оболочки (CP) и движения вируса (MP). Вирус BRV характеризуется наличием длинных нетранслирующихся участков (3' NTR) в области РНК-1 и РНК-2, что объединяет его с другими представителями рода *Nepovirus*, относящимися к подгруппе C. 3' NTR области обоих геномных РНК вируса длиной 1360 и 1363 п.н. для РНК-1 и РНК-2 соответственно имеют высокую степень идентичности (94,8 %) [4, 5]. Установлено, что данный участок генома высококонсервативен у изолятов различных фенотипов и различного географического происхождения [6].

Цель работы – установить нуклеотидную последовательность фрагмента 3' NTR области РНК-2 вируса, выделенного из смородины черной в Беларуси, с последующим сравнением с ранее опубликованными последовательностями данного вируса.

Материалы и методы исследования. Листья смородины черной сорта Память Вавилова с характерными симптомами реверсии были отобраны для диагностики и дальнейшей характеристики изолята вируса BRV. Наличие вируса в растительной ткани определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией и связыванием вируса специфичными антителами (immunocapture–reverse transcription–polymerase chain reaction, IC-RT-PCR).

Экстракцию вирусных частиц проводили с использованием специфичных к вирусу антител (immunocapture extraction, IC) по методике, разработанной A. Lemmetty и др. [7]. В ПЦР-пробирках объемом 200 мкл инкубировали 110 мкл раствора антител (1 : 1000) при 37 °С в течение 4 ч. ПЦР-пробирки трижды промывали 140 мкл PBS-T буфера (8 г NaCl; 2,9 г Na₂HPO₄ × 12H₂O; 0,2 г KH₂PO₄; 0,2 г KCl; 0,5 мл Tween 20 / 1 л H₂O, pH 7,4). Клеточный сок растений получали путем растирания листьев с PBS-ТРО буфером (20 г PVP-40; 2 г овальбумина / 1 л PBS-T буфера). 100 мкл гомогенизированного растительного экстракта (1 : 10) переносили в пробирки с антителами и инкубировали в течение ночи при температуре +4 °С. Промывали пробирки 4 раза 140 мкл PBS-T буфера и один раз 170 мкл стерильного 0,01 М Tris/Cl (pH 8,0) буфера, затем центрифугировали 2 мин при 10 000 оборотов/мин для тщательного удаления остатков Tris/Cl буфера.

Амплификацию выделенного образца проводили с использованием Titan One-Step RT-PCR Kit (Roche) на амплификаторе iCycler (BIO-RAD). Реакционная смесь для проведения RT-PCR имела следующий состав: 2 мкл 5×RT-PCR буфера; 6,3 мкл деионизированной H₂O; 0,4 мкл каждого праймера (10 μM); 0,2 мкл смеси dNTP (10 μM); 0,5 мкл DTT (10 μM); 0,2 мкл смеси ферментов. Общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл. BRV-специфичные праймеры BRAV5/BRAV6 использовали для амплификации фрагмента 3' NTR области РНК-2 вируса [8]. Последовательности праймеров комплементарны 5655–5674 п.н. РНК-2 для праймера BRAV5 (5'-ааассагасссаггтагтаг-3') и 6118–6139 п.н. для BRAV6 (5'-ggacactccatataagtcggc-3'). Длина предполагаемого продукта амплификации 468 п.н.

Температурные условия для RT-PCR были следующими: на этапе обратной транскрипции 50 °C – 30 мин; начальной денатурации 94 °C – 2 мин; амплификация 10 циклов: 94 °C – 10 с, 60 °C – 30 с, 68 °C – 45 с; амплификация 25 циклов с увеличением времени каждого последующего цикла на 5 с: 94 °C – 10 с, 60 °C – 30 с, 68 °C – 45 с; финальная элонгация 68 °C – 7 мин. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 0,5×TBE-буфере. Результаты электрофореза визуализировали при помощи трансиллюминатора GelDoc (BIO-RAD) и программного пакета Quantity One 4.5.

Амплифицированный фрагмент генома вируса секвенировали в лаборатории компании Genomed S. A. (Польша). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета MEGA 4.0 [9]. Множественное выравнивание последовательностей осуществлялось при помощи Clustal W алгоритма. Филогенетические деревья были построены методом Neighbour-Joining. Бутстреп-анализ (1000 псевдореплик) позволил оценить статистическую надежность каждого из узлов построенного дерева. В случае бутстреп-поддержки ниже 70 % статистическая надежность данного узла считалась недостоверной и не указывалась на дендрограмме.

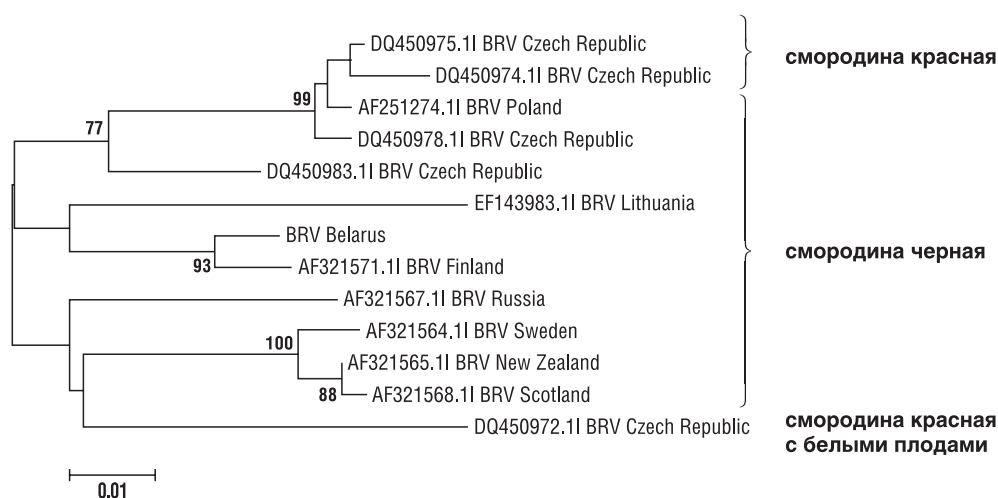
Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований был амплифицирован фрагмент (468 п.н.) 3'-некодируемой области РНК-2 вируса BRV из смородины черной сорта Память Вавилова. После секвенирования ПЦР-продукта получены данные о нуклеотидной последовательности белорусского изолята вируса в области 3' NTR. Длина полученной нуклеотидной последовательности образца составила 367 п.н., а расположение соответствовало 5714–6079 нуклеотидам РНК-2 вируса. Сравнение нуклеотидных последовательностей изолятов вируса, выделенных из разных видов растений и имеющих разное географическое происхождение, с изолятом вируса из Беларуси показало высокий уровень консервативности данной области генома вируса (таблица). Белорусский изолят BRV был на 90,9–98,3 % идентичен последовательностям ранее опубликованных изолятов, причем наибольшую степень родства изолят из Беларуси демонстрировал с изолятом, выделенным из смородины черной в Финляндии. Попарное сравнение нуклеотидных последовательностей показало, что уровень идентичности внутри группы изо-

Процент идентичности нуклеотидных последовательностей 3' NTR области изолятов вируса BRV, выделенных из разных видов растений, по сравнению с белорусским изолятом вируса

GenBank №	Растение, из которого изолят был выделен	Страна происхождения	% идентичности с изолятом BRV из Беларуси
AF321571.1	<i>Ribes nigrum</i>	Финляндия	98,3
AF251274.1	<i>Ribes nigrum</i>	Польша	94,2
AF321567.1	<i>Ribes nigrum</i>	Россия	93,6
AF321565.1	<i>Ribes nigrum</i>	Новая Зеландия	93,3
AF321568.1	<i>Ribes nigrum</i>	Шотландия	93,0
AF321564.1	<i>Ribes nigrum</i>	Швеция	92,4
EF143983.1	<i>Ribes nigrum</i>	Литва	93,3
DQ450978.1	<i>Ribes nigrum</i>	Чехия	93,3
DQ450983.1	<i>Ribes nigrum</i>	Чехия	94,2
DQ450974.1	<i>Ribes rubrum</i>	Чехия	92,4
DQ450975.1	<i>Ribes rubrum</i>	Чехия	93,6
DQ450972.1	<i>Ribes rubrum</i> с белыми плодами	Чехия	90,9

лятов из смородины черной варьировал от 89,5 до 99,7 %. Два изолята, выделенные из растений смородины красной (*Ribes rubrum*), были на 98,9 % идентичны друг другу и на 90,4–99,4 % идентичны изолятам из смородины черной. Изолят вируса из смородины красной с белыми плодами имел большее родство с изолятами из смородины черной (89,5–92,4 % идентичности), чем с изолятами из смородины красной (88,8–89,2 % идентичности).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вируса BRV показал, что изоляты вируса группировались независимо от их географического происхождения или вида растения, из которого они были выделены (рисунок). Белорусский изолят группировался вместе с изолятом из Финляндии при 93 % бутстреп-поддержки. Отдельный кластер образовывали изоляты вируса из Швеции, Новой Зеландии и Шотландии (100 % бутстреп-поддержки). Оба изолята из смородины красной группировались вместе с изолятами из смородины черной из Польши и Чехии (99 % бутстреп-поддержки). Изолят вируса из растений смородины красной с белыми плодами располагался отдельно.



Филогенетическое дерево, построенное с помощью алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 3'-некодируемой области РНК-2 вируса реверсии смородины черной. Цифрами обозначены достоверности (в процентах) расхождения ветвей 1000 альтернативных деревьев, выявленные бутстреп (bootstrap) анализом (больше 70 %). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее одной замене на каждые 100 нуклеотидов

В результате проведенных исследований были подтверждены данные, полученные К. Lehto и др. [6] о высокой степени консервативности 3' NTR области РНК-2 вируса реверсии смородины черной. Согласно их публикации, сравнение последовательностей 10 изолятов BRV из разных стран показало, что изоляты вируса были на 94,1–98,8 % идентичны между собой. Высокая степень консервативности данной области генома вируса предположительно связана с ее значимой биологической функцией или функциями в жизненном цикле вируса BRV. Другие авторы [10], получив 15 новых BRV последовательностей, включая изоляты из смородины красной с красными и белыми плодами, отмечали, что среднее значение идентичности среди исследуемых изолятов было 93,8 %. Корреляции между географическим происхождением и видом растений-хозяев вируса выявлено не было, что соответствует полученным нами результатам.

Вирус BRV является самым вредоносным вирусом черной смородины и находится в списке карантинных патогенов Европейской и Средиземноморской Организации по Защите Растений (EPPO). Отсутствие данных о белорусских изолятах вируса BRV определило необходимость проведения детального анализа данного вируса с использованием ПЦР-диагностики, секвенирования и анализа нуклеотидных последовательностей вируса. Знание о многообразии вирусов, а также локализации консервативных и вариабельных областей внутри вирусного генома важно для диагностики вирусов, прогнозирования распространенности штаммов, преодолевающих устойчивость растений, и разработки современных методов контроля вирусных инфекций.

Заклучение. Впервые был охарактеризован на молекулярном уровне белорусский изолят вируса BRV. В ходе работы был амплифицирован и секвенирован участок 3'-некодируемой области РНК-2 вируса BRV из смородины черной сорта Память Вавилова. Установлен высокий уровень консервативности данной области генома вируса. Белорусский изолят вируса был наиболее родственен изоляту вируса из Финляндии. Филогенетический анализ исследованных изолятов показал, что кластерирование изолятов не зависело от их географического происхождения или растений, из которого изолят был выделен.

Литература

1. Lemmetty A., Latvala S., Jones A. T., McGavin W. J. et al. // *Phytopathology*. 1997. Vol. 87. P. 404–413.
2. Susi P. // *Molecular Plant Pathology*. 2004. Vol. 5. P. 167–173.
3. Latvala S., Susi P., Lemmetty A., Cox S. et al. // *Annals of Applied Biology*. 1997. Vol. 131. P. 283–295.
4. Latvala-Kilby S., Lehto K. // *Virus Research*. 1999. Vol. 65. P. 87–92.
5. Pacot-Hiriart C., Latvala-Kilby S., Lehto K. // *Virus Research*. 2001. Vol. 79. P. 145–152.
6. Lehto K., Lemmetty A., Keränen M. // *Archives of Virology*. 2004. Vol. 149. P. 1867–1875.
7. Lemmetty A., Susi P., Latvala S., Lehto K. // *Acta Horticulture*. 1998. Vol. 471. P. 93–98.
8. Malinowski T., Pluta S., Kuras A., Żurawicz E. // *Integrated Production of Soft Fruits IOBC/wprs Bulletin*. 2000. Vol. 23. P. 21–24.
9. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. // *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24. P. 1596–1599.
10. Přibylková J., Špak J., Petrzik K., Kubelková D. et al. // *European Journal of Plant Pathology*. 2008. Vol. 121. P. 67–75.

E. V. KOLBANOVA, N. N. VALASEVICH, N. V. KUKHARCHIK

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *BLACKCURRANT REVERSION VIRUS* ISOLATE

Summary

Belarusian isolate of *Blackcurrant reversion virus* (BRV) was characterized on molecular level during the study. The high level of conservation of 3'-non-translated region of RNA-2 was revealed for BRV genome. Belarusian isolate was closely related to BRV isolate from Finland. Phylogenetic analysis showed that clustering of investigated isolates didn't depend on their geographical origin or plant-hosts.