

Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси

П.В. Кузмицкая , О.Ю. Урбанович

Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), вирус ямчатости древесины яблони (ASPV) и вирус бороздчатости древесины яблони (ASGV) распространены во всех странах, где возделывается яблоня. В данной работе исследовалось генетическое разнообразие этих патогенов на территории Беларуси. Зараженные различными вирусными инфекциями деревья были обнаружены с помощью метода ОТ-ПЦР в современных садовых насаждениях. Среди старых деревьев, возрастом более 50 лет, зараженных не выявлено. Фрагменты геномов вирусов ACLSV, ASPV и ASGV были клонированы и секвенированы. Анализ нуклеотидных последовательностей свидетельствует о высокой молекулярной вариабельности, сформированной за счет однонуклеотидных замен, реже – однонуклеотидных делеций и инсерций. Некоторый вклад в существующее генетическое разнообразие популяции вирусов также могли вносить и рекомбинационные процессы. Оценка селекционного давления на фрагменты геномов ACLSV, ASPV и ASGV, полученные в настоящем исследовании, а также гомологичные последовательности из базы данных GenBank свидетельствует о том, что они находятся под воздействием отрицательной селекции, за исключением одного кодона в последовательности белка оболочки ACLSV, находящегося под воздействием положительной селекции. При исследовании филогенетических взаимоотношений изолятов вирусов, выделенных в разных странах, четкой зависимости между географическим происхождением и степенью идентичности фрагментов геномов вирусов выявлено не было.

Ключевые слова: вирусы яблони; ОТ-ПЦР; ACLSV; ASGV; ASPV; генетическое разнообразие; селекционное давление.

Distribution and genetic diversity of three apple viruses in Belarus

P.V. Kuzmitskaya , O.Yu. Urbanovich

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV), apple stem pitting virus (ASPV), and apple stem grooving virus (ASGV) are common in all apple cultivating countries including Belarus. The aim of this investigation was to study the genetic diversity of the apple-tree viruses in Belarus. Virus-infected apple trees were identified by RT-PCR in modern horticultural plantations and were not found among old trees aged more than 50 years. The genome fragments of the ACLSV, ASPV, and ASGV viruses detected were cloned and sequenced. The analysis of their nucleotide sequences gives evidence of high molecular variability generated mostly by single nucleotide substitutions and rarely by single nucleotide deletions and insertions. Recombination processes could also make some contribution to the existing genetic diversity of the virus populations studied. Estimates of selective pressure on the genome fragments of ACLSV, ASPV and ASGV obtained in this study as well as homologous sequences from the GenBank database indicate negative selection, except for one codon in the sequence of the ACLSV coat protein, which is under positive selection. The study of phylogenetic relationships between viruses isolated in different countries did not reveal any clear-cut relationship between their geographical origin and the degree of similarity of virus genome fragments.

Keywords: RT-PCR; ACLSV; ASGV; ASPV; genetic diversity; selection pressure.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кузмицкая П.В., Урбанович О.Ю. Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):673-682. DOI 10.18699/VJ16.187

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kuzmitskaya P.V., Urbanovich O.Yu. Distribution and genetic diversity of three apple viruses in Belarus. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):673-682. DOI 10.18699/VJ16.187

ORIGINAL ARTICLE

Received 11.01.2016

Accepted for publication 16.05.2016

© AUTHORS, 2016

Яблоня – важнейшая плодовая культура, возделываемая в странах с умеренным климатом. В Беларуси она занимает большие территории в коммерческих садах и на личных приусадебных участках. Значительный ущерб данной культуре наносят заболевания вирусной этиологии, в частности вызываемые вирусом хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), вирусом борозчатости древесины яблони (ASGV) и вирусом ямчатости древесины яблони (ASPV). ACLSV, ASPV и ASGV являются членами трех различных родов семейства Flexiviridae. Они представляют собой плюс-нитевые одноцепочечные РНК-содержащие вирусы с широким спектром растений-хозяев и распространены во всех странах, где возделывается яблоня, в том числе в Беларуси. Однако генетическая структура популяций вирусов яблони, распространенных на территории страны, не исследована, не установлены филогенетические связи между ними и направления их эволюции. В связи с этим целью данного исследования была оценка генетического разнообразия вирусов ACLSV, ASPV и ASGV в старых и современных насаждениях яблони Беларуси и анализ их изменчивости.

Материалы и методы

Отбор растительного материала для анализа проводили весной и летом 2014 г. на территории Минской, Брестской, Гродненской областей и г. Минска. Исследовались образцы яблони из старых и современных садовых насаждений. В группу старых насаждений входило 126 деревьев возрастом не менее 50 лет: 29 образцов были отобраны на территории Центрального ботанического сада НАН Беларуси, остальные 97 – в Минске и Минском районе в бывших приусадебных и промышленных хозяйствах. В настоящее время деревья не имеют экономической ценности, растут в естественных условиях, и уход за ними не производится. Группу современных насаждений составляли деревья из действующих маточно-черенковых и промышленных садов. Отбор растений проводили в четырех хозяйствах, расположенных на территории Минской, Гродненской и Брестской областей Беларуси.

Все протестированные яблони – 126 старых и 130 современных индивидуальных деревьев – были визуально здоровыми. В качестве положительного контроля при проведении ОТ-ПЦР использовались растения, зараженные соответствующими инфекциями. Препараты РНК были получены из фрагментов листовых пластин или почек, взятых у отдельных растений. Выделение РНК проводили с помощью набора GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, EU) по методике производителя. Для синтеза первой нити кДНК использовали набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, EU) согласно рекомендованному протоколу. Идентификацию вирусов ACLSV, ASGV и ASPV выполняли по методу, описанному в работе (Hassan et al., 2006). В качестве внутреннего контроля в реакции использовали амплификацию гена *nad5* (Menzel et al., 2002).

Продукты амплификации разделяли в 1 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания этидиумбромидом. В качестве маркера молекулярного веса

использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, EU). Выделение продуктов амплификации производили с помощью GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, EU) в соответствии с протоколом производителя. Фрагменты геномов вирусов лигировали в плазмиду pTZ57R/T, которой трансформировали штамм *Escherichia coli* DH5a с помощью InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, EU) согласно рекомендациям производителя. После выращивания на LB-Amp среде из трансформантов выделяли плазмидную ДНК при помощи GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, EU) согласно протоколу производителя. Фрагмент, встроенный в плазмидную ДНК, секвенировали с помощью праймеров к последовательности полилинкера вектора pTZ57R/T M13F и M13R. Для проведения реакции использовали BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Фрагменты геномов вирусов, выделенных из образцов, взятых в качестве положительных контролей, подвергались клонированию и секвенированию совместно с протестированными образцами.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Geneious 7 (триал-версия). Помимо последовательностей, полученных в ходе выполнения данной работы, были использованы некоторые последовательности (или их фрагменты) из базы данных GenBank.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей вирусов ASGV, ASPV, ACLSV выполнено при помощи алгоритма CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Сравнительный анализ выравниваний нуклеотидных последовательностей проведен с помощью пакета программ Datamonkey (Kosakovsky Pond, Frost, 2005a). В качестве модели смещения нуклеотидных замен использована HKY85. Для поиска свидетельств рекомбинационных событий применялся метод SBP (single breakpoint recombination) (Kosakovsky Pond et al., 2006b). Алгоритмы FEL, SLAC и IFEL использованы для оценки соотношения dN/dS (или ω) каждого кодона в выравниваниях (Kosakovsky Pond, Frost, 2005b; Kosakovsky Pond et al., 2006a). Значение p для работы алгоритмов SLAC, FEL и IFEL принято за 0,1. Филогенетический анализ осуществлен с помощью программы Mega6 (Tamura et al., 2013). Филогенетические деревья построены методом Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) с 1000 бутстреп-репликаций.

Результаты

Распространение вирусных инфекций среди старых и современных садовых насаждений яблони

Выявление зараженных вирусами ACLSV, ASGV и ASPV деревьев осуществлялось среди 130 индивидуальных яблонь из современных садовых насаждений, принадлежащих к 60 сортам вида *Malus domestica*, а также среди 12 сортов клоновых подвоев. Все протестированные растения не имели признаков заражения вирусными инфекциями. С помощью мультиплексной ОТ-ПЦР среди них выявлено 12 растений, зараженных ASGV (9,2 % от общего количества деревьев). Вирусом ASPV были заражены 2 яблони (1,5 %). Деревьев, зараженных вирусом

хлоротической пятнистости листьев яблони, обнаружить не удалось.

Инфицированные яблони были обнаружены в Минской, Брестской и Гродненской областях. Зараженные вирусом деревья встречались как среди сортов яблони различного происхождения, так и среди клоновых подвоев (M26, 54-118). Причем среди растений одного сорта могли быть как инфицированные, так и свободные от вирусов растения.

Для оценки распространения вирусных инфекций в старых насаждениях было протестировано в общей сложности 126 индивидуальных деревьев яблони, относящихся по меньшей мере к пяти видам: *Malus × domestica*, *M. baccata*, *M. prunifolia*, *M. sachalinensis*, *M. purpureae*. По результатам тестирования методом ОТ-ПЦР среди них не выявлено деревьев, инфицированных вирусами ACLSV, ASGV и ASPV.

Молекулярная вариабельность фрагментов геномов вирусов яблони

Фрагменты генома вирусов, обнаруженных в садовых насаждениях и представленных в контрольных образцах, были секвенированы. Названия изолятов и номер доступа в GenBank представлены в табл. 1.

ACLSV

Секвенированию подвергался фрагмент генома ACLSV, содержащий участки перекрывающихся рамок считывания двигательного белка и белка оболочки вируса, а также последующий 3'-нетранслируемый регион. Длина последовательности составила 677 нуклеотидов. Нуклеотиды 1–498 полученного фрагмента соответствуют 84–581 нуклеотидам гена, кодирующего белок оболочки референсного генома NC_001409.1. Нуклеотиды 1–223 соответствуют 1096–1319 нуклеотидам гена, кодирующего двигательный белок референсной последовательности. Сравнение полученной последовательности с гомологами из базы данных GenBank показало, что ближайший гомолог со степенью идентичности 99 % (KF661401) и 100 % перекрытием был выделен из яблони сорта Антоновка, растущей в Литве. Множественное выравнивание последовательностей фрагментов гена, кодирующего белок оболочки ACLSV, свидетельствует о том, что большинство мутаций представляют собой единичные замены нуклеотидов. Инсерций и делеций длиной более 2 нуклеотидов не выявлено.

Для определения направления действия естественного отбора, в результате которого было сформировано наблюдаемое разнообразие последовательностей ACLSV, проведена оценка селекционного давления с помощью алгоритмов SLAC, FEL и IFEL. В зависимости от метода анализа было выявлено от 102 до 112 сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (табл. 2). Под действием положительной селекции, согласно алгоритмам SLAC, FEL и IFEL, находится кодон 9. Последний метод определил также кодон 65 как находящийся под положительной селекцией. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что эволюция вируса может происходить за счет рекомбинационных процессов. Поиск потенциальных сайтов рекомбинации с помо-

щью алгоритма SBP выявил такой сайт в позиции 105 ($p = 0,1$).

Анализ филогенетических отношений изолятов вируса, выделенных в разных странах (рис. 1), показал, что белорусский изолят ACLSV находится в близком родстве с несколькими изолятами, выделенными из яблони в Литве, а также с одним изолятом из Китая. Генетическая близость изолятов из разных стран наблюдается и в других кластерах: степень идентичности последовательностей может быть высокой у изолятов вируса, выделенных в значительно удаленных друг от друга географических регионах. Так, например, один из кластеров объединяет изоляты вирусов, выделенные из яблони в Сербии, Литве, Канаде и Китае.

ASPV

Секвенированию подвергались фрагменты генома, кодирующие белок оболочки вируса и фрагмент последующего 3'-нетранслируемого региона. Длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 365–367 нуклеотидов. Всего было секвенировано 12 фрагментов геномов вирусов, выделенных из 9 зараженных деревьев. Максимальная степень идентичности последовательностей составила 99,7 %, минимальная – 82 %. Сравнение с референсной последовательностью генома вируса ASPVNC_003462.2 показало, что нуклеотиды 1–302 полученных последовательностей соответствуют 943–1245 нуклеотидам гена, кодирующего белок оболочки. Анализ секвенированных нами последовательностей, а также их гомологов из базы данных GenBank показал, что генетическое разнообразие было сформировано главным образом за счет однонуклеотидных замен. Поиск потенциальных сайтов рекомбинации, проведенный с помощью алгоритма SBP, выявил один сайт в позиции 70, что свидетельствует о том, что рекомбинационные процессы также вносят свой вклад в формирование молекулярной вариабельности геномов вирусов. Оценка селекционного давления выявила множество сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (от 82 до 84 в зависимости от использованного алгоритма, см. табл. 2), при этом сайтов, находящихся под действием положительной селекции, не выявлено.

Результаты оценки эволюционных отношений белорусских изолятов ASPV с последовательностями из других географических регионов свидетельствуют о генетической разнородности белорусской популяции вируса (рис. 2). Например, изолят KR149242 обладает большей степенью идентичности с последовательностями, выделенными в Индии и Китае, чем с другими последовательностями из Беларуси. В целом группировка ветвей филогенетического древа мало зависит от мест произрастания растений, где был выделен вирус. Например, часть последовательностей из Беларуси оказалась в близком родстве не только с фрагментами генома литовских, польских и чешских вирусов, но также с вирусами из Японии, Индии и Китая. Отдельным кластером выделяются некоторые изоляты, полученных из груши, растущей в Китае. Другие изоляты ASPV из груши находятся в более близком родстве с изолятами, выделенными из яблони, тем не менее они также группируются совместно. Примечательно, что в эту

Table 1. Isolates sequenced and their GenBank accession numbers

Virus	Isolate designation	Apple (rootstock) cultivar	Host plant origin region	GenBank acc. no.
ACLSV	Sakavita-1	Sakavita	Minsk oblast	KC244768
ASPV	ASPV_Verbnae_SMX	Verbnoe	Ditto	KP994189
	ASPV_Antey_5/6_SMX	Antey	»	KP994190
	ASPV_Belsad_12/22_SMX	Belsad	»	KP994191
	ASPV_Elena_35/27_SMX	Elena	»	KP994192
	ASPV_Elena_37/35_SMX	Elena	»	KP994193
	ASPV_SMX_Wel-1	Wealthy	»	KP994194
	ASPV_SMX_Wel-2	Wealthy	»	KP994195
	ASPV_SMX_Wel-3	Wealthy	»	KP994196
	ASPV_Vesyalina_12/13_SMX	Vesyalina	»	KP994197
	ASPV_Vesyalina_12/31_SMX	Vesyalina	»	KP994198
	ASPV_Fan_Sh-2	Champion	»	KR149242
	ASPV_Fan_Sh-1	Champion	»	KR149243
	ASGV	ASGV_Fan_PSub-2	Pamyat Syubarovoy	»
ASGV_HPr_Sh1/5		Champion	Brest oblast	KP994200
ASGV_Pr_54-118-1		54-118	Ditto	KP994201
ASGV_Pr_54-118-2		54-118	»	KP994202
ASGV_Pr_Ida1-1		Idared	»	KP994203
ASGV_Pr_Ida2-1		Idared	»	KP994204
ASGV_Pr_Lig-1		Ligol	»	KP994205
ASGV_Pr_Lig-3		Ligol	»	KP994206
ASGV_Pr_M26-1		M26	»	KP994207
ASGV_Pr_M26-3		M26	»	KP994208
ASGV_Pr_Sh-1		Champion	»	KP994209
ASGV_Sch_HCri-1		Honeycrisp	Grodno oblast	KP994211
ASGV_Sch_HCri-3		Honeycrisp	Ditto	KP994212
ASGV_Sch_Nai-1		Naidared	»	KP994213
ASGV_Sch_Nai-2		Naidared	»	KP994214
ASGV_Sch_OrSin-1		Sinap Orlovskiy	»	KP994215
ASGV_Sch_RedCr-1		Red Craft	»	KP994216
ASGV_Sch_RedCr-2		Red Craft	»	KP994217
ASGV_SMX_Papir-1	Papirovka	»	KP994218	

Table 2. Numbers of sites under negative selection in sequences encoding envelope proteins in ACLSV, ASPV, and ASGV viruses

Method used	ACLSV	ASPV	ASGV
FEL	112	84	55
IFEL	102	86	45
SLAC	107	82	39

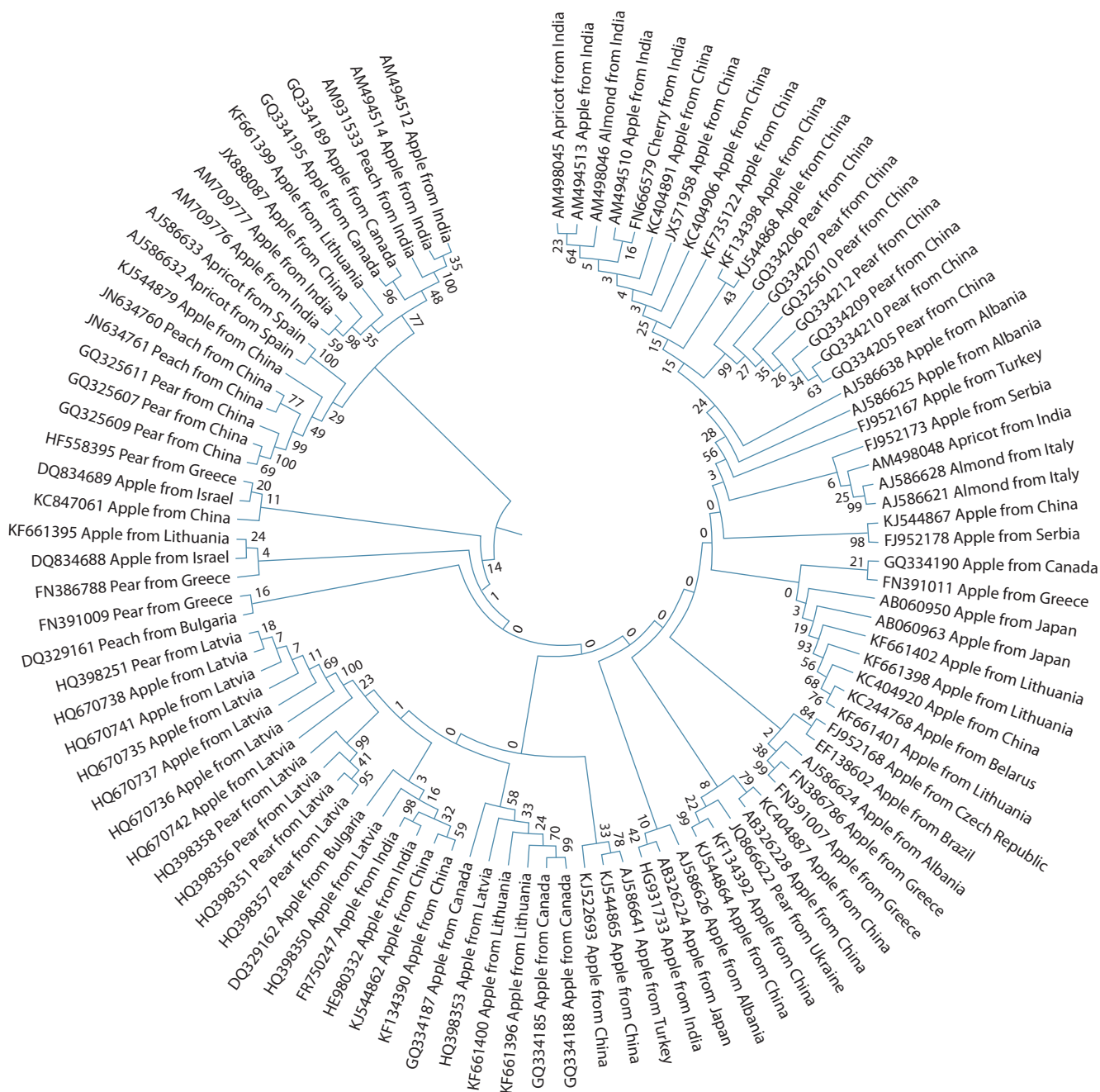


Fig. 1. Phylogenetic relationships between the Belarusian ACLSV isolate and isolates from other countries.

Here and in Fig 2 and 3: Isolate designations on the dendrogram correspond to the GenBank accession numbers. They are followed by the original host species and country of origin. Numerals on tree branches indicate bootstrap values.

группу входят изоляты, выделенные в различных географических регионах, нередко значительно удаленных друг от друга (Китай, Германия, Польша).

ASGV

Проведено секвенирование фрагментов геномов, кодирующих белок оболочки вируса. Длина полученных последовательностей составила 272–275 нуклеотидов. Полученные фрагменты гомологичны С-концевому участку 241-kDa полипротеина, кодирующему фрагмент белка

оболочки вируса, и соответствуют нуклеотидам 6005–6278 открытой рамки считывания 241-kDa полипротеина из генома NC_001749. Всего было секвенировано 19 изолятов вируса, выделенных из 12 зараженных яблонь. Степень идентичности рассматриваемых фрагментов колеблется от 96,7 до 100 %. Из них выделено две группы полностью идентичных последовательностей, каждая из которых была получена из отдельного зараженного дерева. В первую группу вошли последовательности КР994203, КР994204, КР994207, КР994213. Во вторую – последова-

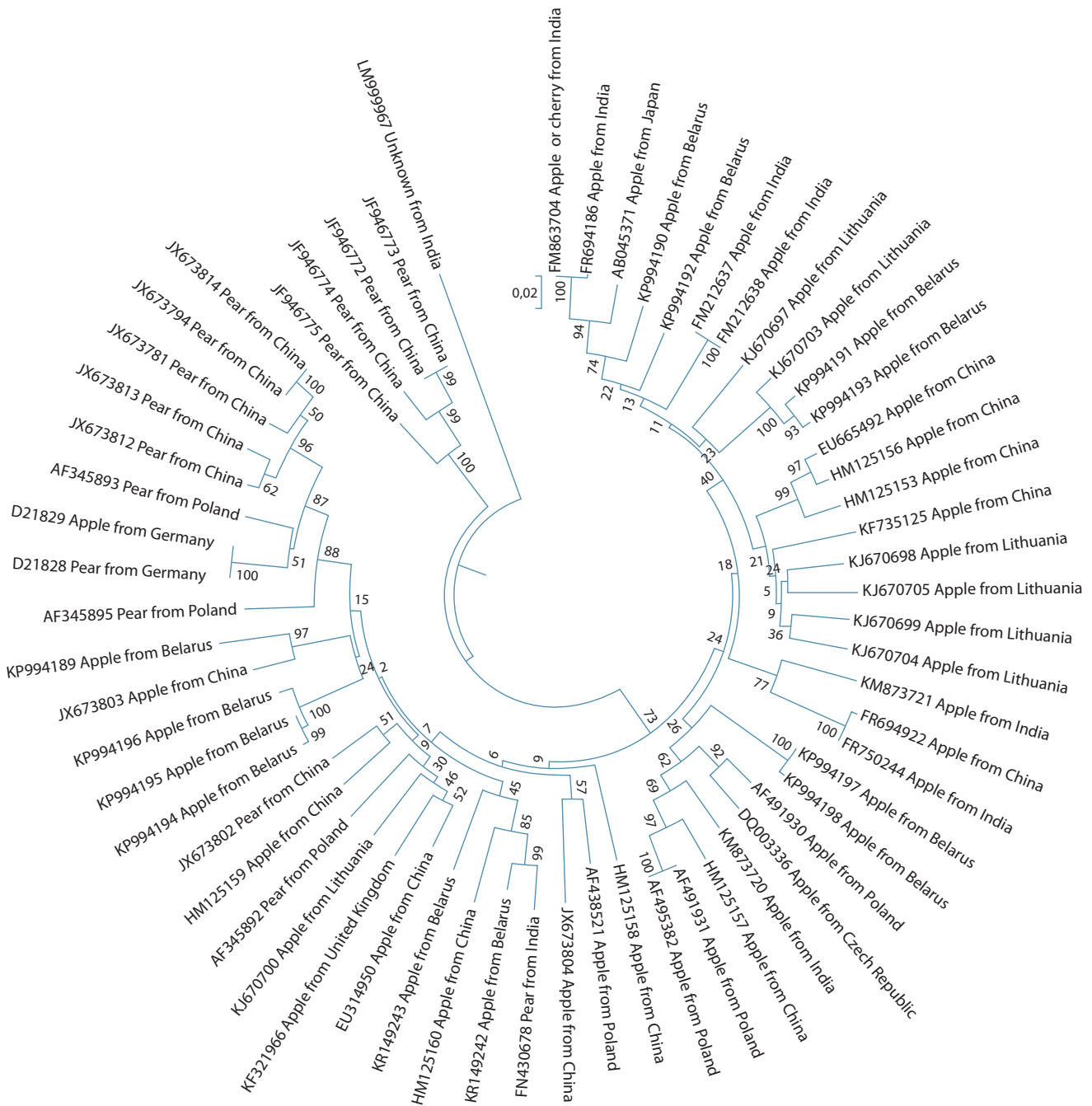


Fig. 2. Phylogenetic relationships between Belarusian isolate of ASPV and the isolates from other countries.

тельности КР994209 и КР994215. Для дальнейших анализов было использовано по одной последовательности из каждой группы. Кроме того, у трех последовательностей обнаружены мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. В одном случае это было вызвано делецией двух нуклеотидов (КР994202), во втором – инсерцией одного нуклеотида (КР994201); в третьем случае возникновение стоп-кодона произошло из-за однонуклеотидной замены (КР994199). В целом инсерции и делеции наблюдаются значительно реже по сравнению с однонуклеотидными заменами. Помимо этого, в формирование генетического разнообразия вируса вносят вклад рекомбинационные

процессы. Так, с помощью алгоритма SBP был найден потенциальный сайт рекомбинации в позиции 207. Оценка селекционного давления, проведенная с помощью трех алгоритмов, свидетельствует о влиянии отрицательной селекции на исследуемый участок генома вируса. В зависимости от использованного алгоритма выявлено 39–55 сайтов, находящихся под действием отрицательной селекции (см. табл. 2).

На филогенетическом древе, представленном на рис. 3, белорусские изоляты ASGV находятся в одном кластере. Наиболее близки к ним оказались последовательности, выделенные из груши в Украине. Изоляты ASGV группи-

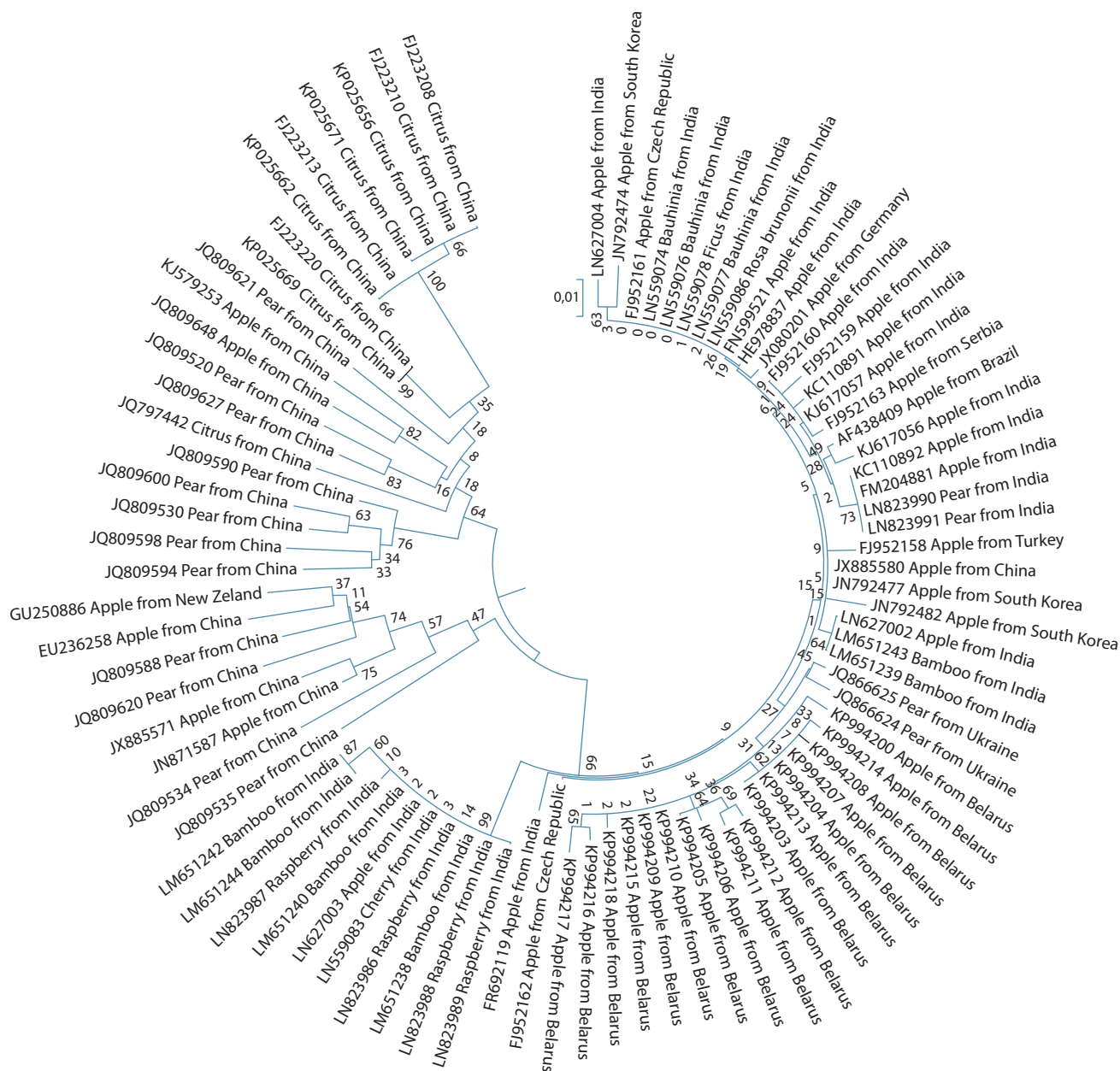


Fig. 3. Phylogenetic relationships between between the Belarusian ASGV isolate and isolates from other countries.

руются в три кластера. В первый входят исключительно последовательности, выделенные в Китае из различных растений-хозяев (цитрусовых, груши, яблони). Второй кластер объединяет несколько последовательностей, выделенных из яблони и груши в Китае, а также одну последовательность из новозеландской яблони. Третий и самый большой кластер включает в себя две группы последовательностей. Одна из них представлена только последовательностями, полученными в Индии из различных растений-хозяев (малины, бамбука, вишни, яблони), другая объединяет изоляты вируса, выделенные в различных географических регионах из самых разных растений. В нее входят изоляты, выделенные в странах Европы из яблонь (Чехия, Германия, Сербия, Беларусь)

и груш (Украина), Южной Америки (один изолят из бразильской яблони), а также множество изолятов, полученных в странах Азии. Среди них последовательности из яблонь, груш, бамбука и некоторых других растений из Индии, Южной Кореи и Китая.

Обсуждение

В современных садовых насаждениях яблони в Беларуси встречаются с различной частотой вирусы ASPV, ACLSV и ASGV. Эти вирусы распространены как в соседних с Беларусью странах (Poniedziałek et al., 2001; Paduch-Cichal et al., 2005; Gospodaryk et al., 2008; Pūpolā et al., 2011; Сироткин, 2012; Stankienė et al., 2012; Yoon et al., 2014), так и в географически удаленных от нее (German

et al., 1997; Clover et al., 2003; Lovisolo et al., 2003; Shim et al., 2004; Youssef et al., 2010; Liu et al., 2014). Однако нам не удалось выявить вирусы среди старых насаждений, в которых возраст деревьев превышал 50 лет. Вероятно, заражение вирусами препятствует долголетию деревьев, и инфицированные растения погибают в более раннем возрасте. В пользу этого предположения говорит то, что зараженные растения становятся более уязвимыми к различным неблагоприятным факторам окружающей среды (Campbell, 1963; Zawadzka, 1989). Возможно также, что отсутствие вирусных инфекций в старых садовых насаждениях связано с разной технологией выращивания саженцев, применявшейся ранее и в настоящее время.

Исследованные нами фрагменты геномов вирусов яблони характеризуются довольно высокой дивергенцией. Минимальная идентичность нуклеотидных последовательностей у изолятов одного и того же вируса, выделенных на территории Беларуси, составила 82 и 96,7 % для вирусов ASPV и ASGV соответственно. Результаты других исследований также свидетельствуют о значительном генетическом разнообразии этих вирусов. Степень идентичности генов, кодирующих белок оболочки ASPV у изолятов, полученных в Польше, составляла 70,7–93,5 % (Komorowska et al., 2011). Последовательности двух геномов ACLSV, выделенных на территории Китая, имели степень идентичности 95,1 % (Niu et al., 2012). При изучении генетического разнообразия вирусов плодовых культур в Латвии обнаружено, что десять изолятов ACLSV имели степень идентичности 3'-терминальных регионов 77,5–97,4 %, девять изолятов ASPV имели степень идентичности от 60,3 до 91,4 % на нуклеотидном уровне, а фрагменты белка оболочки у девяти изолятов ASGV были идентичны на 93,7–98,9 % (Pūpolā et al., 2011).

Наше исследование показало, что одно дерево яблони может быть заражено несколькими генетическими вариантами вирусов (см. табл. 1). Так, из яблони сорта Уэлси были выделены три изолята ASPV (KP994194–KP994196), из яблони сорта Шампион – два изолята ASPV (KR149242 и KR149243). По два генетических варианта ASGV выделено из деревьев яблони сортов Лигол, Хани Крип, Найдаред, Ред Крафт, Айдаред и клоновых подвоев 54-118 и M26. В то же время в остальных случаях различий между фрагментами геномов вирусов, выделенных из одного и того же растения, выявлено не было. Случаи заражения деревьев смесью вариантов вирусов упоминались и ранее: в частности, выделение из одного дерева трех вариантов генотипа вируса ACLSV, между которыми наблюдалась высокая степень дивергенции (Candresse et al., 1995).

Высокое генетическое разнообразие РНК-содержащих вирусов объясняется высокой частотой возникновения спонтанных мутаций (10^{-6} – 10^{-4} замен на нуклеотид на одну копию генома) (Combe, Sanjuan, 2014). Поэтому популяции РНК-содержащих вирусов могут существовать в виде смеси разнообразных мутантных генотипов (Doningo, 2002). Высокая скорость мутаций геномов может рассматриваться в качестве адаптивной способности, позволяющей вирусам быстро приспосабливаться к паразитизму на разных видах в пределах царства (Schneider, Roossinck, 2001). Мутации могут приводить к возникновению нефункциональных генов, что наблюдалось нами

при секвенировании фрагментов генов, кодирующих белки оболочки ASGV. При этом все три обнаруженных изолята с нефункциональными генами имеют различные мутации.

Множественные выравнивания фрагментов геномов вирусов свидетельствуют о том, что большинство мутаций, обеспечивающих генетическое разнообразие вирусов, представляют собой однонуклеотидные замены. Инсерции и делеции нуклеотидов встречаются значительно реже. Определенный вклад могут вносить и рекомбинационные процессы. В исследованной выборке потенциальные сайты рекомбинации были обнаружены в последовательностях всех трех вирусов.

Определение селекционного давления на фрагменты геномов вирусов ACLSV, ASPV и ASGV показало, что все они находятся под действием отрицательной селекции, за исключением одного кодона у вируса хлоротической пятнистости листьев яблони. Исследования, проведенные в разных странах, свидетельствуют о доминировании отрицательной селекции в эволюции вирусов, поражающих яблоню. Однако отдельные нуклеотиды или регионы геномов вирусов могут находиться под влиянием положительной селекции (Komorowska et al., 2011; Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014; Yoon et al., 2014). Возможно, такое селективное давление обусловлено участием одного вирусного белка в множестве процессов. Например, белки капсида вирусов растений помимо непосредственного формирования вирусных частиц участвуют в репликации вирусных нуклеиновых кислот, перемещении вирусных частиц от одной клетки к другой, формировании симптомов, супрессии РНК-сайленсинга, системном распространении вируса (Callaway et al., 2001; Lu et al., 2004; Yaegashi et al., 2007). Такая многофункциональность может приводить к тому, что критически важными для жизнедеятельности вируса оказываются сразу множество аминокислот в белке. Это накладывает определенные ограничения на жизнеспособность мутантных генотипов. Тем не менее существует некоторая вероятность, что часть мутантных генотипов также воспроизводится за счет функционирующих копий генома.

На направление действия естественного отбора влияет несколько факторов. Один из них – способ распространения вирусов. Показано, что у последовательностей поверхностных структурных белков трансмиссивных вирусов человека отношение dN/dS значительно ниже, чем у последовательностей вирусов, передаваемых другими способами. Сходные результаты были получены при исследовании генов, кодирующих белки оболочки растительных вирусов (Chare, Holmes, 2004). Также показано, что наличие иммунной системы у хозяина вируса влияет на направление действия естественного отбора. Согласно (Drummond et al., 2003), вирусы животных находятся под действием положительной селекции. Вероятно, отсутствие у растений подобной иммунной системы является причиной того, что для инфицирующих их вирусов нет необходимости непрерывно изменять свои поверхностные структуры.

В представленном исследовании нам не удалось обнаружить прямой зависимости между степенью дивергенции геномов вирусов и географической удаленностью

мест, где они были выделены, и таким образом проследить направление их распространения. С одной стороны, белорусский изолят ACLSV оказался близок трем изолятам из граничащей с ней Литвы (см. рис. 1), с другой – в этот же кластер вошли изоляты, выделенные из яблони в Китае, Японии, Канаде. Изоляты из граничащей с Беларусью и Литвой Латвии оказались близки изолятам из Китая и Индии. В то же время группы изолятов, выделенные из груши в Китае, находятся на максимальном расстоянии друг от друга и оказались более близки изолятам из яблони других стран.

Отсутствие непосредственной связи между степенью дивергенции вируса и географическим положением наглядно видно из дендрограммы филогенетического сходства изолятов ASPV (см. рис. 2). Так, выделенные в Беларуси изоляты вируса находятся в разных кластерах и соседствуют с изолятами как из Литвы, так и из Индии, Японии и Китая. Более компактным оказался кластер выделенных в Беларуси последовательностей ASGV (см. рис. 3). Однако к ним генетически близки не только вирусы, выделенные из груши в соседней Украине, но и вирусы, выделенные из яблони и бамбука в Индии.

Попытки найти связь между географическим происхождением и степенью идентичности фрагментов геномов вирусов растений неоднократно предпринимались исследователями различных научных центров. Однако четкой картины распределения образцов в зависимости от места отбора пробы выявить не удалось, несмотря на значительную вариабельность вирусных геномов (Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014). Кластеризация изолятов в зависимости от растения-хозяина наблюдается чаще, хотя и она не является абсолютной (Komorowska et al., 2011; Liebenberg et al., 2012; Liu et al., 2014). Выявленная нами генетическая дифференциация вирусов ACLSV, ASPV и ASGV также не связана непосредственно с регионом их распространения (см. рис. 1–3).

Отчасти это может объясняться обменом посадочным материалом между странами или получением посадочного материала пловодческими учреждениями разных стран из общего источника. В этом случае распространение вирусной инфекции может происходить при вегетативном размножении растений.

Передача вирусных инфекций с помощью насекомых может быть причиной генетической схожести вирусов, выделенных из растений разных видов, но произрастающих в одном регионе. Такое распределение наблюдается для вируса ASGV (см. рис. 3). В пользу этого пути распространения заболеваний говорят результаты исследования в китайской провинции Шэньси, во время которого было обнаружено свидетельство рекомбинационных процессов между изолятами вируса ACLSV, выделенными из различных растений-хозяев (Liu et al., 2014). Однако нельзя исключить, что на степень дивергенции последовательностей вируса оказывают влияние случайные замены нуклеотидов. Возможно также, что картина формируется под действием жесткой отрицательной селекции, характерной для вирусов растений.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E.T., Sit T.L., Lommel S.A. The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. Annual Review Phytopathology. 2001;39:419-460. DOI 10.1146/annurev.phyto.39.1.419.
- Campbell A.I. The effect of some latent virus infections of the growth and cropping apples. J. Horticultural Sciences. 1963;38:15-19. DOI 10.1080/00221589.1963.11514054.
- Candresse T., Lanneau M., Revers F., Grasseau N., Macquaire G., German S., Malinowski T., Dunez J. An immuno-capture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of the apple chlorotic leaf spot virus. Acta Horticulturae. 1995;386:136-147. DOI 10.17660/ActaHortic.1995.386.17.
- Chare E.R., Holmes E.C. Selection pressures in the capsid genes of plant RNA viruses reflect mode of transmission. J. General Virology. 2004;2004:3149-3157. DOI 10.1099/vir.0.80134-0.
- Clover G.R.G., Pearson M.N., Elliot D.R., Tang Z., Smales T.E., Alexander B.J.R. Characterization of a strain of *Apple stem grooving virus* in *Actinidia chinensis* from China. Plant Pathol. J. 2003;52:371-378. DOI 10.1046/j.1365-3059.2003.00857.x.
- Combe M., Sanjuan R. Variation in RNA virus mutation rates across host cells. PLOS. Pathogens. 2014;10:1-7. DOI 10.1371/journal.ppat.1003855.
- Domingo E. Quasispecies theory in virology. J. Virol. 2002;76:463-465. DOI 10.1128/JVI.76.1.463-465.2002.
- Drummond A., Pybus O.G., Rambaut A. Inference of viral evolutionary rates from molecular sequences. Adv. Parasitology. 2003;54:331-358. DOI 10.1016/S0065-308X(03)54008-8.
- German-Retana S., Bergey B., Delbos R.P., Candresse T., Dunez J. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV). Archives Virology. 1997;142:833-841. DOI 10.1007/s007050050122.
- Gospodaryk A., Budzanivska I., Demyanenko F., Polischuk V. Distribution of apple latent viruses in Kiev region. Vestnik Kievskogo natsionalnogo universiteta im. T. Shevchenko. Seriya Biologiya = Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2008;51:25-27.
- Hassan M., Myrta A., Polak J. Simultaneous detection and identification of four pome fruit viruses by one-tube pentaplex RT-PCR. J. Virological Methods. 2006;133:124-129. DOI 10.1016/j.jviromet.2005.11.002.
- Komorowska B., Siedlecki P., Kaczanowski S., Hasiów-Jaroszewska B., Malinowski T. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of *Apple stem pitting virus*. Virus Res. 2011;158:263-267. DOI 10.1016/j.virusres.2011.03.003.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. Bioinformatics. 2005a;21:2531-2533. DOI: 10.1093/bioinformatics/bti320.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W. Not so different after all: A comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. Mol. Biol. Evol. 2005b;22(5):1208-1222. DOI 10.1093/molbev/msi105.
- Kosakovsky Pond S.L., Frost S.D.W., Grossman Z., Gravenor M.B., Richman D.D., Leigh Brown A.J. Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. PLOS. Computational Biology. 2006a;2(6):530-538. DOI 10.1371/journal.pcbi.0020062.
- Kosakovsky Pond S.L., Posada D., Gravenor M.B., Woelk C.H., Frost S.D.W. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. Mol. Biol. Evol. 2006b;23(10):1891-1901. DOI 10.1093/molbev/msl051.
- Liebenberg A., Moury B., Sabath N., Hell R., Kappis A., Jarausch W., Wetzel T. Molecular evolution of the genomic RNA of Apple stem grooving capillovirus. J. Mol. Evol. 2012;75(3-4):92-101. DOI 10.1007/s00239-012-9518-z.
- Liu P., Li Z., Song S., Yunfeng Wu Y. Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Shaanxi, China. Phytoparasitica. 2014;42:445-454. DOI 10.1007/s12600-013-0381-2.

- Lovisol O., Accotto G.P., Masenga V., Colaricco A. An isolate of *Apple stem grooving virus* associated with Cleopatra mandarin fruit intumescences. *Fitopatologia Brasileira*. 2003;28:54-58.
- Lu R., Folimonov A., Shinataku M., Li W.X., Falk W.B., Dawson W.O., Ding S.-W. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *PNAS*. 2004;101:15742-15747. DOI 10.1073/pnas.0404940101.
- 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. Virological Methods*. 2002;99:81-92. DOI 10.1016/S0166-0934(01)00381-0.
- Niu F., Pan S., Wu Z., Jiang D., Li S. Complete nucleotide sequences of the genomes of two isolates of apple chlorotic leaf spot virus from peach (*Prunus persica*) in China. *Arch. Virol.* 2012;157:783-786. DOI 10.1007/s00705-011-1195-5.
- Paduch-Cichal E., Szyndel M.S., Tomala K. Preliminary results of the study on viruses occurring in 'Mutsu' apple cultivar trees. *Phytopathol. Pol.* 2005;37:87-90.
- Poniedziałek W., Nosal K., Porębski S., Banach P. Evaluation of 'Jonagold' apple trees on M9 rootstock produced in different nurseries. *Folia Horticulturae*. 2001;13/2:23-29.
- Pūpola N., Moročko-Bičevska I., Kāle A., Zeltiņš A. Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia. *J. Phytopathol.* 2011;159(9):597-605. DOI 10.1111/j.1439-0434.2011.01812.x.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406-425.
- Schneider W.L., Roossinck M.J. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *J. Virology*. 2001;75(14):6566-6571. DOI 10.1128/JVI.75.14.6566-6571.2001.
- Shim H., Min Y., Hong S., Kwon M., Kim D., Kim H., Choi Y., Lee S., Yang J. Nucleotide sequences of a Korean isolate of *Apple stem grooving virus* associated with black necrotic leaf spot disease on pear (*Pyrus pyrifolia*). *Molecular and Cells*. 2004;18:192-199.
- Sirotkin Ye.N. Apple latent virus spreading in Central Chernozem region. *AgroXXI = AgroXXI*. 2012;4-6:19-21.
- Stankienė J., Mažeikienė I., Gelvonauskienė D., Šikšnianienė J.B., Bobinas Č. Virological assessment of stock planting material of apple and raspberry cultivars. *Žemdirbystė = Agriculture*. 2012;99:93-98.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30(12):2725-2729. DOI 10.1093/molbev/mst197.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 1994;22(22):4673-4680. DOI 10.1093/nar/22.22.4673.
- Yaegashi H., Isogai M., Tajima H., Sano T., Yoshikawa N. Combinations of two amino acids (Ala⁴⁰ and Phe⁷⁵ or Ser⁴⁰ and Tyr⁷⁵) in the coat protein of Apple chlorotic leaf spot virus are crucial for infectivity. *J. General Virology*. 2007;88:2611-2618. DOI 10.1099/vir.0.82984-0.
- Yoon J.Y., Joa J.H., Choi K.S., Do K.S., Lim H.C., Chung B.N. Genetic diversity of a natural population of *Apple stem pitting virus* isolated from apple in Korea. *Plant Pathol. J.* 2014;30(2):195-199. DOI 10.5423/ppj.nt.02.2014.0015.
- Youssef S.A., Moawad S.M., Nosseir F.M., Shalaby A.A. Detection and identification of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* affecting apple and pear trees in Egypt. *Julius-Kühn-Archiv*. 2010;427:248-250.
- Zawadzka B. The influence of virus and mycoplasma diseases on frost damage of apple trees. *Acta Horticulturae*. 1989;235:59-67. DOI 10.17660/ActaHortic.1989.235.7.