

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ЩЕТИНІНА ГАННА СЕРГІЇВНА

УДК: 578.85/86

**МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ДЛЯ
УКРАЇНИ Х-ВІРУСУ ХОСТИ**

03.00.06 – вірусологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор

Будзанівська Ірина Геннадіївна,
ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського
національного університету імені Тараса Шевченка,
в.о. завідувача кафедри вірусології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Щербатенко Іван Степанович,
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу фітопатогенних вірусів

кандидат біологічних наук

Бова Тетяна Олександрівна,
Інститут сільськогосподарської мікробіології
та агропромислового виробництва НААН,
завідувач лабораторії вірусології

Захист дисертації відбудеться «20» березня 2018 року о 14.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 03127, м. Київ, проспект акад. Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434.

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці імені М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий «17» лютого 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

В.В. Джаган

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Х-вірус хости – небезпечний патоген, що належить до родини *Alphaflexiviridae*, рід *Potexvirus*, який інфікує хосту. *Hosta Tratt* – це трав'яниста багаторічна тіневитривала рослина, яка є яскравим представником родини *Liliacea*. В Україні рослини хости використовуються в декоративному квітникуарстві, озелененні і створенні ландшафтних композицій. На світовому ринку садових культур рослини хости посідають перше місце за обсягом збуту (Currier, 1996; De La Torre, 2012). Така поширеність сприяє зростанню кількості нових сортів, яка на даний час складає більше 12 тисяч.

У комерційних розплідниках існує проблема первинного інфікування рослин Х-вірусом хости. Масове інфікування рослин зумовлене механічною трансмісією патогену. Вчасному діагностуванню збудника перешкоджає тривала безсимптомна персистенція вірусу в уражених рослинах хости. З часом на уражених ХВХ рослинах розвиваються локальні та системні вірусні симптоми: мозаїка, хлороз, скручування, гофрування, знебарвлення чи зміна кольору листка, карликовість. ХВХ було детектовано в багатьох Європейських країнах, на території Південної Америки, Австралії, Нової Зеландії (Windham, 2013). Саме тому Європейська організація захисту рослин (EPPO) внесла Х-вірус хости до переліку потенційно карантинних збудників.

На сьогоднішній день не існує ефективних методів оздоровлення інфікованих Х-вірусом хости рослин. Досвід західних дослідників демонструє неефективність хімічних препаратів для боротьби з вірусною інфекцією. Їх використання приносить шкоду як рослині, знижуючи її природну здатність протидіяти вірусу, так і здоров'ю людини за рахунок токсичності та канцерогенності певних компонентів (Zilis, 2009; Gleason, 2009).

Найбільш перспективним методом боротьби з Х-вірусом хости є попередження його поширення. Рання діагностика дозволить вилучати інфіковані рослини і вчасно зупинити епідемію.

Зважаючи на це, актуальним є вирішення наступних завдань: встановлення наявності ХВХ в Україні та його циркуляції, вивчення молекулярно-біологічних характеристик і філогенетичних зв'язків українського ізоляту з іншими світовими ізолятами, отримання специфічної антисироватки для тест-системи для ідентифікації збудника.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Робота виконувалась у межах науково-дослідницької роботи кафедри вірусології ННЦ «Інституту біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за темою «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та виробіоти України з використанням біоінформаційних технологій». Номер держреєстрації: 0111U004649.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було вивчення молекулярно-біологічних особливостей українського ізоляту Х-вірусу хости, встановлення його філогенетичних зв'язків з іншими ізолятами ХВХ, вивчення особливостей будови геному українського ізоляту ХВХ.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Детектувати Х-вірус хости.
2. Отримати специфічну антисироватку для подальшої діагностики Х-вірусу хости методом ІФА та ЗТ-ПЛР з імунним захопленням.
3. Провести скринінг колекцій хост ботанічних садів на наявність ХВХ.
4. Дослідити біологічні властивості українського ізоляту ХВХ.
5. Отримати повногеномну послідовність українського ізоляту ХВХ.
6. Провести філогенетичний аналіз та встановити походження українського ізоляту ХВХ з метою з'ясування можливих шляхів надходження вірусу в Україну.

Об'єкт дослідження: Х-вірус хости.

Предмет дослідження: молекулярно-біологічні властивості та філогенетичний аналіз українського ізоляту Х-вірусу хости.

Методи дослідження: візуальне обстеження колекцій хости, біологічне тестування, твердо фазний імуноферментний аналіз в модифікації «непрямий», електронна мікроскопія, спектрофотометричне визначення концентрації та чистоти вірусного препарату, екстракція тотальної РНК, електрофорез в поліакридамідному гелі за модифікацією Лемлі, імуноелектроблоттинг, полімеразна ланцюгова реакція зі зворотньою транскрипцією, електрофорез у агарозному гелі, створення ДНК бібліотек, визначення нуклеотидних послідовностей геному та гена білка оболонки (сиквенування), філогенетичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. На території України Х-вірус хости був детектований вперше. Проведено скринінг ХВХ найбільших колекцій ботанічних садів України. Були визначені та зареєстровані в NCBI нуклеотидні послідовності гена білка оболонки українського ізоляту ХВХ (GenBank KJ406186.1). Філогенетичний аналіз ХВХ показав низький рівень дивергенції ділянки білка оболонки та високий відсоток гомології послідовностей українського ізоляту з новозеландським, польським та американським ізолятами. Більш детальне порівняння повногеномних послідовностей ХВХ вказує на спорідненість українського та американського ізолятів Х-вірусу хости й надходження збудника в Україну з посадковим матеріалом саме з цієї країни.

Практичне значення одержаних результатів.

В ході роботи було отримано високоякісну діагностичну сироватку для ідентифікації Х-вірусу хости методом ІФА. Було запропоновано ефективну методику діагностики ХВХ в тканинах хости методом ІФА. Отримана повногеномна послідовність ХВХ дозволила вивчити особливості геному вірусу українського ізоляту. Встановлено еволюційні зв'язки українського ізоляту з представниками родини та роду вірусу. Розроблено методичні

рекомендації постановки ЗТ-ПЛР, які будуть використовуватися в навчальному процесі кафедри вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною роботою автора. Всі етапи роботи, в тому числі пошук інформації, опрацювання літературних джерел, розробка схем експерименту, отримання, узагальнення та інтерпретація експериментальних даних були здійснені автором дисертації особисто.

Формування основних положень і висновків дисертаційної роботи, а також підготовка публікацій на основі отриманих результатів проведені за участю наукового керівника д.б.н., професора І.Г. Будзанівської.

Частина досліджень: виділення субматричних РНК, створення ДНК-бібліотек, повногеномне секвенування – виконано на базі лабораторії Талліннського технічного університету, Естонія (зав. лабораторії Ерріке Труве, с.н.с. Меріке Сомера). Автор висловлює щире подяку естонським колегам за корисні поради і допомогу в плануванні і проведенні експерименту та обговоренні результату.

Апробація результатів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на міжнародних конференціях: The Conference dedicated to 50-th Anniversary of the Virology Department «Virology: the past, the present, the future», Kyiv, Ukraine, April 12, 2012. VIIth International conference «Bioresources and viruses», Kyiv, Ukraine, Sep. 10-13, 2013. Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region, 11th - 13th of June in Laulasma, Estonia. 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology, 8-13 September 2014. Cracow, Poland. VIII International conference «Bioresources and viruses», 12-14th September, Kyiv, Ukraine, 2016.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 робіт, з них 6 статей, 5 – матеріали та тези наукових конференцій. Права співавторів не порушені.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 132 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали та методи», розділу власних досліджень та їх обговорення, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку літератури (104 посилань) та додатків. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 45 рисунків і 3-ох таблиць.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури складається з семи розділів, в яких наведені сучасні відомості про рослини *Hosta spp.* та загальна характеристика X-вірусу хости. Висвітлена інформація про діагностику збудника та можливі шляхи боротьби з ним. Зміст огляду літератури обґрунтовує необхідність та доцільність виконання роботи.

Матеріали та методи. Матеріалом слугували зразки листя та насіння хости, відібрані в Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка НАН України (рослини 67 сортів хости та насіння 5 сортів хости) та в ботанічному саду ім. акад. О.Б. Фоміна КНУ імені Тараса Шевченка (5 видів рослин хости). Також у роботі використовувалися рослини-індикатори родин Пасльонові, Гарбузові та Лободові.

Для первинного вивчення українського ізоляту Х-вірусу хости були відібрані зразки листя за візуальними ознаками вірусної інфекції. В роботі застосовували твердо фазний імуоферментний аналіз (ІФА) в модифікації «непрямий» та Ат до серологічно спорідненого Х-вірусу картоплі та до українського ізоляту ХВХ.

В якості матриці для ПЛР використовували тотальну РНК, виділену за допомогою *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen, Великобританія), та геномну РНК, отриману методом імунного захоплення.

Для детекції ХВХ проводили зворотньо-транскрипційну ПЛР з використанням кіта *SYBERSKRIPT-II* (Invitrogen, USA) та послідовностей праймерів до ділянки білка оболонки Х-вірусу хости (Blanchette, 2003).

Продукти ампліфікації фракціонували за допомогою методу електрофорезу в агарозному гелі (1,5%) (Sigma, США) з використанням маркерів *Thermo Scientific Gene Ruler 100bp DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific, США).

Виділення Х-вірусу хости проводили з використанням хлороформу, очистку здійснювали методом диференційного центрифугування. Концентрацію вірусу та його чистоту визначали спектрофотометрично (Гнутова, 1993).

Візуалізували вірусні часточки методом електронної мікроскопії. Дослідження проводили на трансмісійному електронному мікроскопі SEO-TEM (лабораторний корпус ННЦ «Інститут біології та медицини») та на трансмісійному електронному мікроскопі JEM-1400 (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України).

Для отримання антивірусної сироватки до українського ізоляту Х-вірусу хости проводили імунізацію кролів. Якість отриманої антисироватки перевіряли титруванням і визначенням специфічності до відповідних антигенів методами ІФА та імуно-електроблоттингу («Хійу Каллур», Латвія) з використанням набору маркерних білків *LMW* («Pharmacia», Швеція).

Виділення субматричної РНК (18s & 28s RNA) проводилося з використанням *TRIzol* реагенту (Sigma, США).

Приготування ДНК-бібліотек для повногеномного сиквенування проводилося за протоколом *Tru Seq Small RNA Sample Preparation Kit* (Illumina, США).

Сиквенування послідовностей українського ізоляту Х-вірусів хости проводилось у лабораторії Оксфордського університету, Велика Британія, та у *Estonian genome centre*, місто Тарту, Естонія. Отримані результати

порівнювались з вибіркою послідовностей, представлених у базі даних *NCBI* за допомогою програми *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*.

Вирівнювання послідовностей проводили за допомогою програми *CLUSTALW* або *MUSCLE*, *MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 7)*.

Первинна детекція ХВХ в Україні

Для виявлення ХВХ в Україні використовувались рослини *Hosta Tratt* Національного ботанічного саду імені М.М.Гришка НАН України, колекція якого є найбільшою в Україні та щорічно оновлюється рослинами нових видів та сортів.

Для детального дослідження зразки листя *Hosta Tratt* відбиралися за візуальними симптомами, такими як: системний, прижилковий та міжжилковий хлорози, знебарвлення, скручування, гофрування та некротизація листків. Загалом було відібрано п'ять зразків хости чотирьох різних сортів: *Hosta Sum and substance*, зразок 1, *Hosta Sum and substance*, зразок 2 (Рис. 1 а), *Hosta Striptease* (Рис 1 б), *Hosta Lady Guinevere* (Рис. 1 с), *Hosta X*.

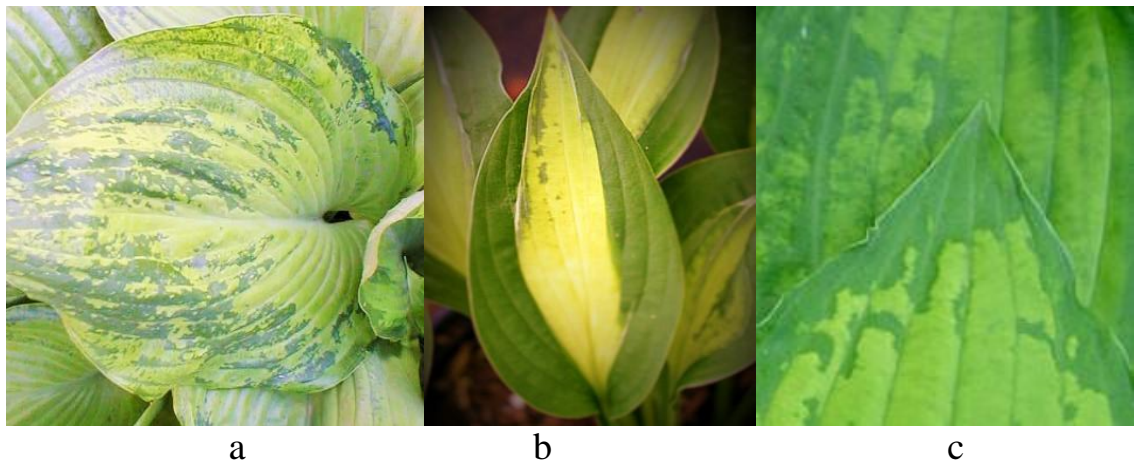


Рис. 1. Хлоротичні симптоми на листках рослин *Hosta Sum and substance* зразок 2 (а), *Hosta Striptease* (б), *Hosta Lady Guinevere* (с).

В подальшому зразки використовувалися для проведення ІФА з використанням Ат до серологічно спорідненого Х-вірусу картоплі.

У зразках *Hosta Sum and substance* (зразок 1), *Hosta Striptease*, *Hosta Lady Guinevere* та *Hosta X* коефіцієнт поглинання не перевищив позначки 0,1, що свідчило про відсутність серологічного антигену. Натомість у зразку *Hosta Sum and substance* (зразок 2) показник поглинання перевищив 0,2, що було розцінено як такий, що містить серологічний Аг. Для подальшої детекції зразки піддавалися електронно-мікроскопічному дослідженню та ЗТ-ПЛР.

Для встановлення наявності та морфології вірусних часточок використовувався препарат, отриманий з другого зразку хости сорту *Hosta Sum and substance*, який був виділений, очищений та сконцентрований за загальноприйнятою методикою для вірусів роду *Potexvirus* (Гнупова, 1993).

Проведена електронна мікроскопія зразків візуалізувала вірусні частки (Рис. 2.).

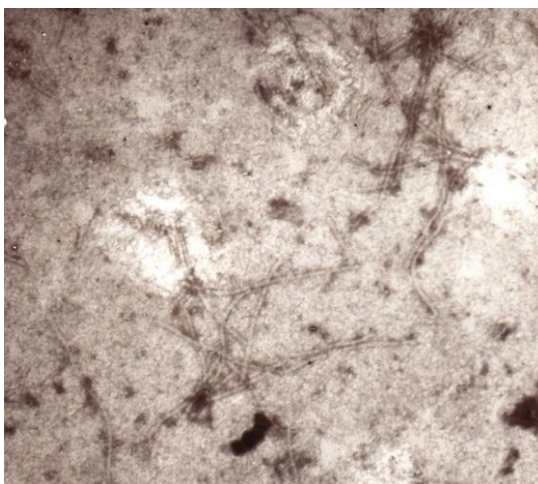


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення ХВХ (Інструментальне збільшення 20000).

Аналіз мікрофотографій дозволив встановити морфологію вірусу – гнучкі нитковидні віріони, а також розміри вірусних часточок, що склали 470-580 нм в довжину та 13 нм в діаметрі. Дана морфологія є характерною для представників роду *Potexvirus*.

Для подальшої ідентифікації отриманого вірусу була проведена ЗТ-ПЛР з використанням специфічної пари праймерів до ХВХ.

Методика постановки реакції була модифікована.

С впродовж 5 хв, під час прогрівання відбулася денатурація білка оболонки та вивільнення вірусної РНК. В подальшому зразки використовувалися для проведення ЗТ-ПЛР. Метою даної модифікації було запобігти можливій втраті вірусної РНК в результаті її екстракції, а також зменшити собівартість однієї реакції для детекції. В результаті реакції був отриманий продукт гена білка оболонки відповідної довжиною 706 бп, який в подальшому був сиквенований. Підготовка зразків для сиквенування проводилася в Оксфордському університеті (Велика Британія).

Отримана послідовність була проаналізована за допомогою програми BLAST, на онлайн ресурсі NCBI. Результати аналізу послідовностей вказують на майже 100% подібність з послідовностями ХВХ різних ізолятів, що представлені в NCBI.

В результаті проведення візуального огляду колекції рослин хости національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України (м. Київ) були відібрані зразки з різними симптомами. Результати ІФА з антитілами до Х-вірусу картоплі підтвердили наявність серологічно спорідненого Х-вірусу хости (роду *Potexvirus*) в *Hosta Sum and substance* зразок 2. Методом електронної мікроскопії були виявлені вірусні частки з типовою морфологією для ХВХ. Для подальшої детекції ХВХ було модифіковано

полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією з праймерами до ділянки білка оболонки ХВХ та отримано продукт ампліфікації розміром 706 бр. Результати аналізу послідовності показали наявність ХВХ у досліджуваних зразках.

Отже у 2012 році в Україні був вперше виділений ХВХ.

Одержання специфічної антисироватки до ХВХ

Отримані результати нашо вхнули нас на розробку надійної, ефективної та недорогої тест-системи для виявлення ХВХ-інфекції. Зважаючи на високий попит на рослини хости у зеленому господарстві дана тест-система дозволить своєчасно виявляти уражені рослини і не допускати розповсюдження інфікованого посадкового матеріалу.

На першому етапі зі зразків хости сорту *Sum and substance*, в якому було попередньо встановлено наявність Х-вірус хости, за допомогою хлороформу виділили вірус вмісний матеріал, очистили та сконцентрували його методом диференційного центрифугування. Аналізуючи дані спектрофотометричного дослідження за допомогою формули Едельгоха, визначили концентрацію вірусу у препараті, що склала 3,1 мг/мл. Чистоту визначили співвідношенням коефіцієнтів поглинання для амінокислотної та для нуклеїнової кислоти (E_{260} – коефіцієнт поглинання для амінокислот, E_{280} – для нуклеїнових кислот), значення яких склало 1,09, що відповідає значенню для представників *Potexvirus* (Гнутова, 1993).

Отриманий вірусний препарат був перевірений. В результаті електронномікроскопічного дослідження було показано, що отриманий очищений вірусний препарат є вільний від рослинних решток та залишків клітинних органел. Розмір візуалізованих вірусних частинок склав 470-580 та $13 \pm 0,5$ нм в діаметрі, за морфологією – гнучкі нитковидні частинки.

В подальшому очищений вірусний препарат використовували для отримання специфічної антисироватки. Її якість перевірили визначенням титру (ІФА) і специфічності до відповідних антигенів методом імуноблоттингу. Так, робоче розведення склало 1:8000 при титрі 1:16000 (Рис. 3).

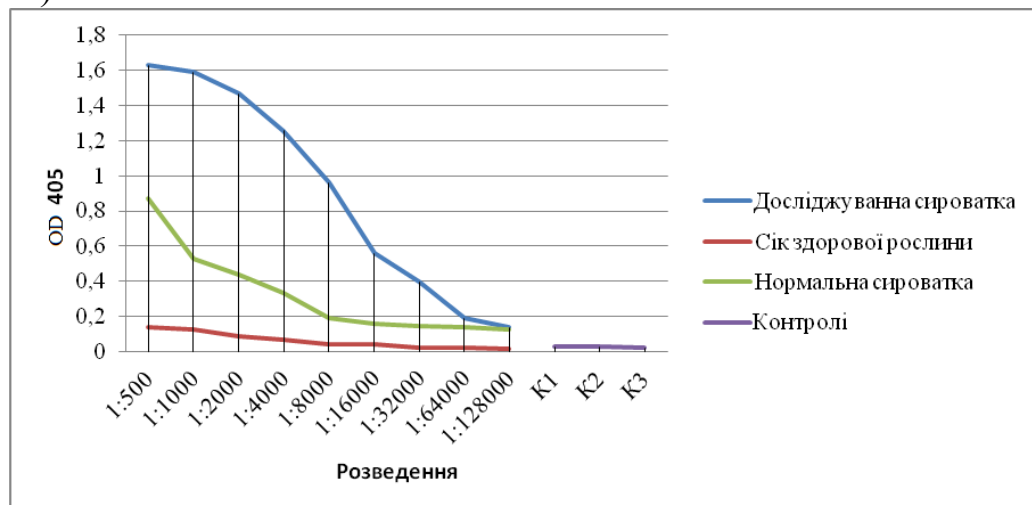


Рис. 3. Визначення титру отриманої сироватки до ХВХ.

Результати ІФА, що показані на діаграмі (Рис.3), демонструють те, що значення коефіцієнту поглинання досліджуваної сироватки більше ніж вдвічі перевищило значення для нормальної сироватки, що свідчить про відсутність хибно позитивного результату.

Результати перевірки специфічності отриманої антисироватки методом імуноблоттингу продемонстрували наступні результати: при взаємодії ізоляту ХВХ із гомологічними Ат на нітроцелюлозній мембрані спостерігалася чітка смуга, що за маркерною шкалою дорівнює масі 25 кДа, що відповідає масі білка оболонки ХВХ. При взаємодії соку здорової хости із Ат не спостерігалось утворення смуг, що свідчить про відсутність специфічної реакції з рослинними білками та підтверджує специфічність отриманої антисироватки.

Отже, була отримана специфічна антисироватка до українського ізоляту ХВХ з робочим розведенням 1:8000 при титрі 1:16000 для подальшого скринінгу Х-вірусу хости серологічними методами.

Скринінг колекцій хост. Модифікація методики ідентифікації ХВХ

Отримання діагностичних антитіл у достатній кількості дозволило нам провести роботу у напрямку модифікації етапу виділення РНК. Метою було зменшення собівартості аналізу одного зразку для подальших досліджень.

Була розроблена та апробована модифікація ЗТ-ПЛР з імунним захопленням. Суть модифікації полягає у виділенні вірусної РНК замість тотальної РНК. Адсорбовані специфічні антитіла утворюють комплекси антиген-антитіло з вірусними частками, після прогрівання препаратів отримуємо геномну вірусну РНК.

Для проведення ЗТ-ПЛР з імунним захопленням були відібрані 18 зразків рослин хости з НБС імені М.М. Гришка НАНУ. Візуалізація продуктів ампліфікації методом електрофорезу засвідчила наявність очікуваного продукту 706 bp в 5-ти зразках з 18-ти: *H. Halcyon*, *H. Crispula Maek*, *H. Gold Standart*, *H. Great Expectation*, *H. Ultraviolet lightz* 18 досліджуваних. Методика продемонстрована своєю ефективністю для рутинної діагностики ХВХ. В подальшому з метою встановлення динаміки поширення ХВХ в колекції ботанічних садів Києва проводився скринінг колекцій.

Візуальне обстеження колекції рослин

З літературних джерел відомо, що ХВХ-інфекція може протікати як безсимптомно, так і з проявом низки симптомів (Lewandowski, 2008). Для проведення скринінгу колекції хост Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України та Ботанічного саду імені О.Б. Фоміна відбирали зразки, що характеризувалися різними симптомами: системний, прижилковий, міжжилковий хлорози, знебарвлення листкової пластинки, скручування та гофрування листка, некроз.

На рослинах сорту *Hosta Undulata* спостерігалось збільшення прожилок (Рис. 4 а.). На рослинах *Hosta Crispula Maek* (Рис. 4 б) спостерігалось гофрування та деформація листкової пластини.



а

б

Рис. 4. Збільшення прожилок на *Hosta Undulata* та деформація листової пластини *Hosta Crispula Maek*.

Рослини *Hosta Great Expectations* (Рис. 5 а) демонстрували гофрування листової пластини. На рослинах *Hosta Venticosa* (Рис. 5 б) спостерігався міжжилковий хлороз.



а

б

Рис. 5. Гофрування листової пластини на рослинах *Hosta Great Expectations* (а), міжжилковий хлороз на рослинах *Hosta Venticosa* (б).

На листках рослин *Hosta Halcyon* спостерігався системний хлороз, знебарвлення та просвітління жилок листка. Прижилковий хлороз спостерігався на рослинах *Hosta Udulata*. На рослинах *Hosta Wide Brim* спостерігалось збільшення прожилок. Зразок рослин *Hosta X* (ряд 18) демонстрували деформацію листових пластинок та прижилковий хлороз. *Hosta Ultraviolet light* та *Hosta Gold Standart* так само демонстрували гофрування листків. Листки *Hosta Paul Glory* мали значну деформацію листової пластинки. На листках *Hosta Abiqua moonbeam* спостерігався міжжилковий хлороз, як і на рослинах *Hosta August Moon*. На рослинах *Hosta Siboldiana* спостерігалась деформація листової пластинки. На *Hosta Whirl wind* спостерігався міжжилковий хлороз. Листя *Hosta Twilight* демонструвало системний хлороз.

Для встановлення походження симптомів на рослинах хости різних сортів проводилася постановка ІФА в модифікації «непрямий» з використанням отриманої нами антисироватки до ХВХ.

Моніторинг колекцій хост на наявність ХВХ серологічним методом
Проведений аналіз колекцій ботанічних садів міста Києва продемонстрував ефективність антитіл сироватки до ХВХ. Аналіз колекції НБС ім. М.М. Гришка НАНУ у 2013 році методом ЗТ-ПЛР з імунним

захопленням встановив 5 інфікованих зразків рослин хости таких сортів: *Hosta Ultraviolet light*, *Hosta Stiletto*, *Hosta Sum and substance*, *Hosta Great Expectations*, *Hosta Gold Standar* – серед 18 досліджуваних.

Повторний розширений скринінг колекції у 2016 році виявив 15 інфікованих зразків рослин хости таких сортів: *Hosta cv. Halcyon*, *Hosta cv. August Moon*, *Hosta cv. Pilgrim*, *Hosta longiper var. latifolia*, *Hosta fortune cv. Albopicta*, *Hosta cv Kiwi*, *Hosta cv. Patriot*, *Hosta cv. Phyllis Campbell*, *Hosta Siboldiana*, *Hosta plantaginea Aschers*, *Hosta cv. Midwest Magic*, *Hosta cv Feather Boa*, *Hosta Sum Tub*, *Hosta clausa*, *Hosta cv. Lacy Belle*. Однак серед зразків, в яких був детектований ХВХ, налічувалось 9 сортів рослин хости, які щойно надійшли до колекції ботанічного саду.

Зважаючи на той факт, що всі нові надходження рослин до ботанічного саду проходять карантин, можна зробити висновок, що світові селекціонери та офіційні постачальники посадкового матеріалу не дотримуються усіх вимог та не контролюють епідеміологічний процес серед рослин хости, що в результаті призводить до неконтрольованого поширення ХВХ у світі.

Натомість результати скринінгу 5 видів рослин хости, представлених у колекції ботанічного саду ім. О.Фоміна вказують на відсутність ХВХ у рослинах. Це пояснюється тим, що дана колекція не оновлюється імпортованими рослинами.

Зважаючи на широке використання рослин *Hosta sp.* в озелененні і ландшафтному дизайні та присутність ХВХ в екологічних умовах України, необхідно проводити контроль за посадковим матеріалом та розповсюдженням вірусу за допомогою ранньої діагностики методом ІФА з використанням Ат до ХВХ.

Встановлення спектру рослин-індикаторів українського ізоляту ХВХ

Для дослідження біологічних особливостей українського ізоляту ХВХ проводили біологічне тестування на таких індикаторних рослинах: кабачок цуккіні сорт «Цукіша» (*Cucurbita pepo ssp.*), момордіка (*Momordica charantia*), тютюн махорка (*Nicotiana rustica*), томат їстівний (*Lycopersicon esculentum*), перець овочевий товстий (*Capsicum annuum ssp. Grossum FiL.*), диня посівна (*Melo sativus*), дурман індійський (*Datura metel L.*), тютюн Бентхама (*Nicotiana benthamiana*).

Результати експериментального ураження продемонстрували наявність симптомів лише у рослин томату їстівного (*Lycopersicon esculentum*), перцю овочевого (*Capsicum annuum ssp. Grossum FiL.*), тютюну Бентхама (*Nicotiana benthamiana*). На листках томату були зафіксовані великі (1-1,5 мм) некрози світло-коричневого кольору, на перці – великі (0,5-1,5 мм) некрози світло-коричневого кольору, на тютюні – мозаїка. На інших тест-рослинах не було зафіксовано жодних видимих симптомів. Однак, методом ІФА встановлена наявність антигенів ХВХ тільки в зразках рослин тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та перцю овочевому (*Capsicum annuum*).

Отримані нами дані співпадають з даними літературних джерел стосовно високої специфічності та виключності взаємодії ХВХ лише з

рослинами хости, та з рослинами *Nicotiana bentamiana* при експериментальному ураженні (Lockhard, 2006). Однак було встановлено, що український ізолят ХВХ здатний уражувати також перець овочевий.

Дослідження насіннєвої передачі ХВХ

На даний час відомо лише два шляхи передачі ХВХ: вегетативний та механічний. Для визначення інших методів поширення ХВХ було проведено дослідження здатності українського ізоляту до насіннєвої передачі.

Насіння відбирали з колекції Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка в період після цвітіння. Рослини, пророщені з насіння, досліджували методом ІФА в модифікації «непрямий» з використанням специфічних антитіл до ХВХ. Серед шести досліджуваних зразків Х-вірус хости був детектований в рослинах *Hosta Sum and Substance* (Рис.6).

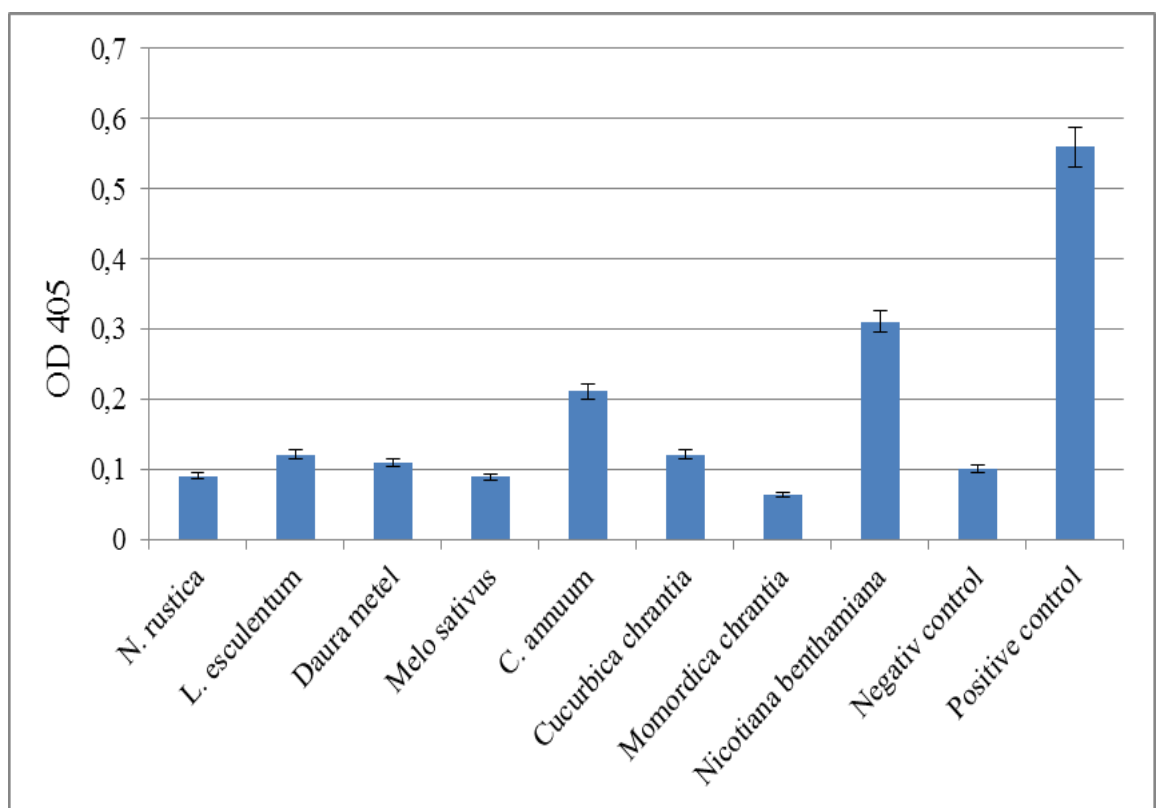


Рис. 6. Результати ІФА діагностики насіння рослин хости НБС ім. М.М. Гришка НАНУ.

Результати дослідження вказують на здатність вірусу передаватися насінням. В Європі досліджень у цьому напрямку не проводилося, так як комерційне розмноження рослин хости проводять живцюванням, а не пророщуванням насіння, адже в такому разі втрачається сортова приналежність.

Аналіз нуклеотидних послідовностей Х-вірусу хости

Першими кроками у вивченні особливостей геному українського ізоляту ХВХ (KJ406186.1 Ukraine 2014) було порівняння його нуклеотидних послідовностей з послідовностями представленими в світових базах даних ізолятами ХВХ (Таб. 1).

Таблиця 1.

Порівняння нуклеотидних та амінокислотних послідовностей білка оболонки різних ізолятів ХВХ, представлених в NCBI

Назва ізоляту	% Подібності н.к.	% Подібність а.к.
KJ406186.1 Ukraine 2014		
FJ821705 Poland2009	100	100
FJ821703 Poland 2009	99,1	99,4
FJ821704 Poland 2009	99,3	99,6
JF301950 CzechRepublic 2011	99,6	100
FJ403380 USA OH 2009	99,8	100
FJ903387 USA TN 2009	99,8	100
AJ517352 SOUTH KOREA 2003	99,3	99,6
JX535294 China 2013	99,3	99,4
FJ903412 USA TN 2009	99,6	100
FJ903408 USA TN 2009	99,8	100
JX891455 Iran2014	99,6	99,7
JF732917 NewZealand 2011	100	100
FJ903399 USA TN 2009	99,3	100
KJ406186 CzechRepublic 2011	99,3	100
FJ903413 USA TN 2009	99,6	99,6
JX891456 Iran 2014	98,9	99,2
JX891453 Iran 2014	98,9	99,2
JX891455 Iran 2014	99,6	99,7

Виявилось, що український ізолят має найвищий відсоток подібності (понад 99% за нуклеотидними послідовностями та біля 100% за амінокислотними послідовностями) з новозеландським, польським та американськими ізолятами.

Для визначення генетичної спорідненості українського ізоляту ХВХ з відомими був використаний метод найбільшої правдоподібності (Maximum Likelihood method), який є дискретним методом з використанням моделі T92+G (General Reversible Mitochondrial) підібраної за допомогою програми MEGA7. (Jones, 1992; Adachi, 1996) (Рис.7).

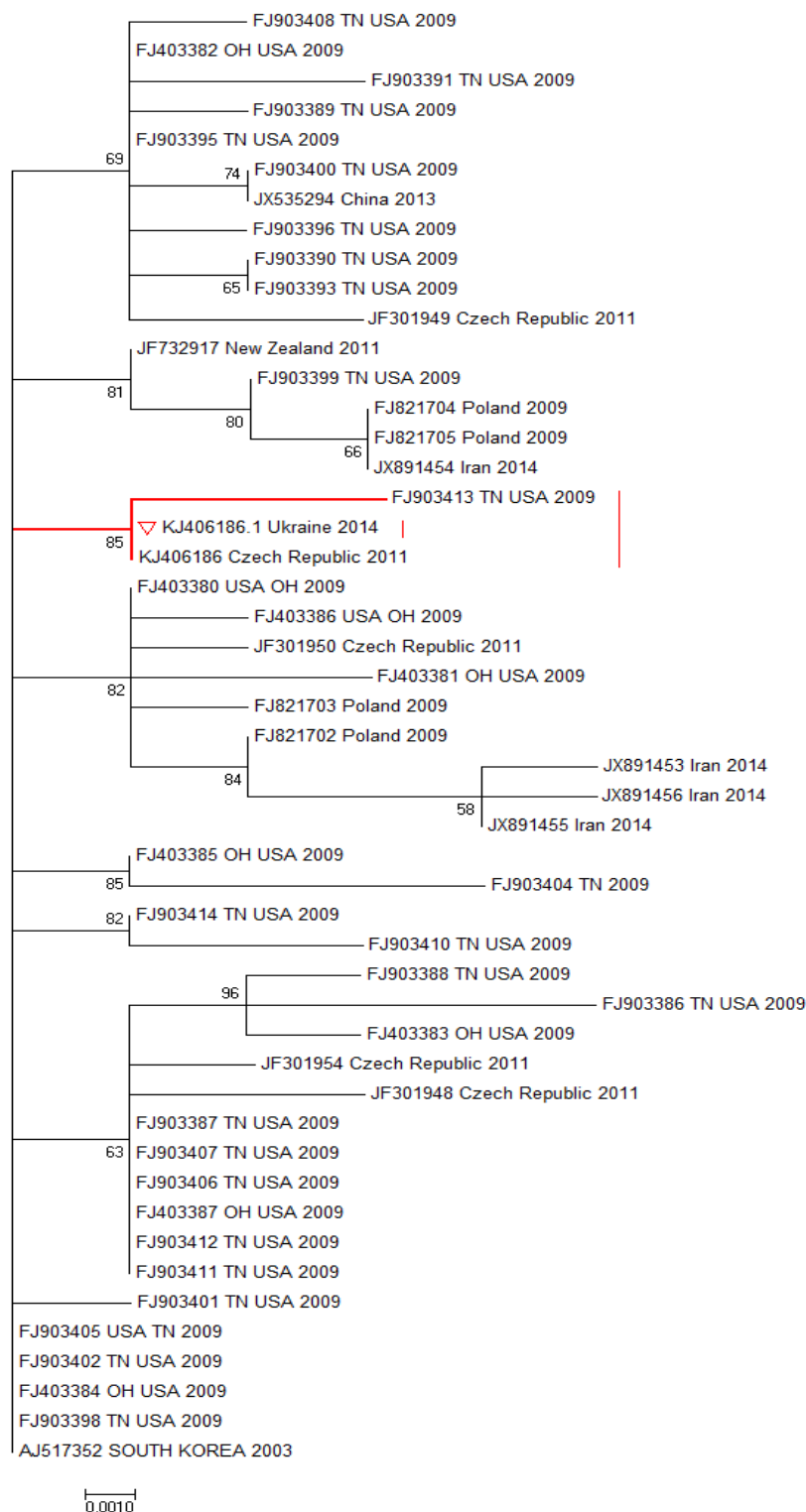


Рис. 7. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей білка оболонки (CP) відомих ізолятів ХВХ. Метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method), бутстреп 1000.

Як видно з отриманого філогенетичного дерева, український ізолят утворив гілку з ізолятом з Чеської Республіки, вочевидь, вони мають спільного предка.

При порівнянні послідовностей гена білка оболонки українського ізоляту з усіма представленими ізолятами зі світової бази даних (NCBI) число

амінокислотних заміщень на сайт між послідовностями становить 0,017. При цьому максимальний відсоток подібності українського ізоляту склав 100% з новозеландським, польським та американським ізолятами, а середнє значення подібності склало 99,4%.

Отже угруповання ізолятів ХВХ в групі не демонструють чітких географічних зв'язків, а також залежності від сортової приналежності рослин, з яких був ізольований патоген.

Повногеномне сиквенування Х-вірусу хости

З розвитком молекулярних та філогенетичних методів дослідження сучасна наука може дати відповіді на безліч питань: як змінюється геном вірусу, як від цих змін буде залежити стратегія його розвитку, які взаємозв'язки існували чи існують з іншими представниками царства *Vira*. Повногеномне сиквенування методом *Next generation sequencing* дозволяє розширити ці дослідження. Завдяки даному методу сиквенування можливо отримати повністю розшифровану послідовність геному будь-якого розміру.

На першому етапі отримання повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ було виділено РНК з використанням *TRIzol® Reagent* зі зразків рослин хости сортів *Hosta Wide Brime*, *Hosta Gold Standart*, *Hosta One Man's*, *Hosta Twilight*, *Hosta Venticosa steam*, *Hosta Stilleto*.

Наступним кроком було створення індексованих ДНК-клонів (TruSeq® Small RNA). В подальшому ці зразки були передані до естонського геномного центру, університет Тарту, Естонія. Сиквенування проводилося на апараті фірми *HiSeq2500 (Illumina Inc.)*.

Для роботи використовували програмне забезпечення *PuTTY*. Для обробки отриманих послідовностей використовувалась програма для асамблювання коротких послідовностей *Oasis*. Після обробки отриманих даних утворилися послідовності різної довжини, кожна з яких перевірили в програмі *BLAST*. Аналіз даних продемонстрував наявність послідовності, більшої за 6000 пар основ, з високим відсотком подібності з Корейським ізолятом Х-вірусу хости (NCBI: NC_011544.1).

Філогенетичний аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ

Для порівняння отриманої послідовності українського ізоляту Х-вірусу хости використовувалися чотири послідовності, представлені в NCBI. Для побудови філогенетичного дерева методом максимальної правдоподібності (*Maximum Likelihood method*) використовувалась модель *Tamura-Nei*, підібрана за допомогою програми *MEGA7* (Kumar, 2015; Hasegawa, 1985). В якості кореня використовували послідовності Х-вірусу картоплі (*PVX*), який належить до одного роду з ХВХ (Рис.8).

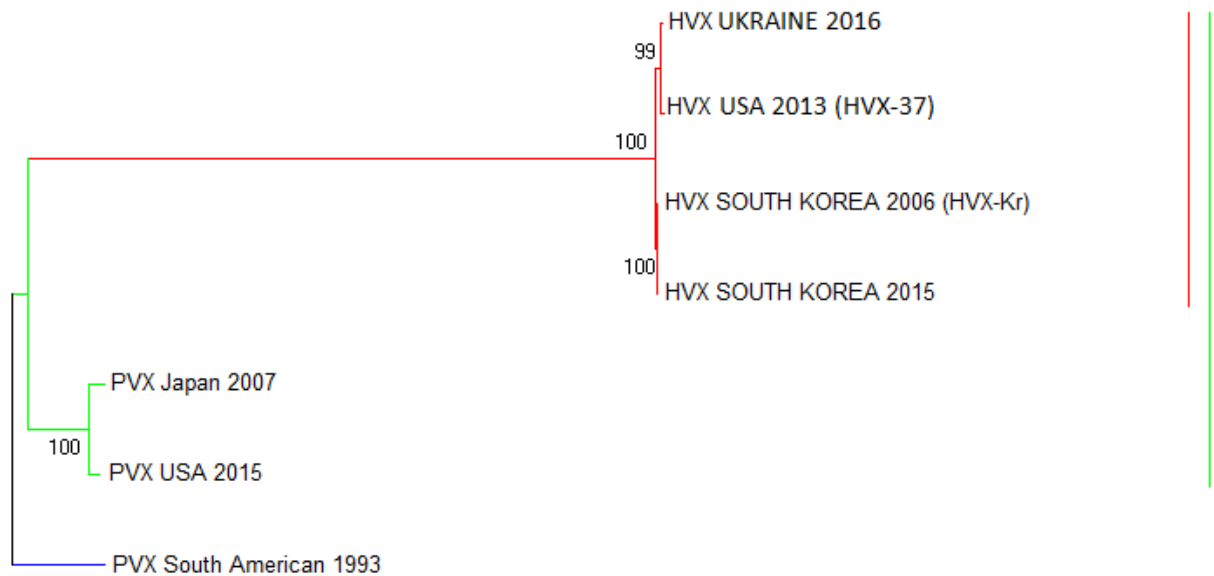


Рис. 8. Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей геному HVX. Метод максимальної правдоподібності (Maximum Likelihood method) , бутстреп 1000.

Аналіз повногеномної послідовності українського ізоляту ХВХ (6430 bp) (GenBank: KX033798.1) з іншими ізолятами продемонстрував 99% ідентичності з американським ізолятом HVX-37 та 97,5% подібності з ізолятом з Кореї, HVX-Kr. Усі ізоляти ХВХ утворили окрему кладу, відокремившись від ізолятів ХВК при 100% значенні бутстреп підтримки.

Була виявлена заміна нуклеотида у старт-кодоні ORF4 гена білка руху. Наявність неканонічного старт-кодону підтвердилося додатковим секвенуванням за Сенгером. В українському ізоляті ініціація відбувається з кодона UUG, як і в ізолята з Сполучених Штатів (U.S. isolate; JQ9116980, однак у ізолята з Кореї такої заміни виявлено не було (Korean isolate; AJ620114) (De La Torre, 2012).

Таким чином, використання новітніх методів та сучасних методик дослідження збільшує обсяг інформації та дозволяє розширити розуміння молекулярних процесів розвитку Х-вірусу хости.

ВИСНОВКИ

У результаті виконання дисертаційної роботи було проведено візуальні обстеження, серологічні та молекулярно-біологічні дослідження Х-вірусу хости, визначено нуклеотидні послідовності та здійснено філогенетичний аналіз українського ізоляту; проведено скринінг на наявність вірусу у ботанічних садах країни з використанням власно розробленої діагностичної антисироватки.

Головні наукові та практичні результати роботи сформовані у наступних висновках:

1. Вперше у 2012 році в Україні був детектований Х-вірус хости за допомогою електронної мікроскопії, серологічних та молекулярно-біологічних методів.

2. Отримано та апробовано антисироватку для подальшого скринінгу Х-вірусу хости методом ІФА, встановлено її специфічність та чутливість (робоче розведення 1:8000 при титрі 1:16000).

3. Проведений скринінг колекцій ботанічних садів м. Києва з використанням отриманої антисироватки до ХВХ виявив, що колекція рослин хости ботанічного саду імені Олександра Фоміна Київського національного університету імені Тараса Шевченка не уражена Х-вірусом хости, натомість було виявлено, що ХВХ активно циркулює в колекції НБС ім. М.М. Гришка НАНУ (5 інфікованих сортів хост з 18 досліджуваних у 2013 році та 15 інфікованих сортів з 68 досліджуваних у 2016 році).

4. Дослідження біологічних властивостей українського ізоляту Х-вірусу хости продемонструвало, що вірус уражує рослини тютюну (*Nicotiana benthamiana*) та перцю овочевого (*Capsicum annuum*). Вперше встановлено, що український ізолят Х-вірус хости здатний передаватися через насіння.

5. Філогенетичний аналіз ХВХ показав низький рівень дивергенції ділянки капсидного білка (99,6% за нуклеотидними та до 100% за амінокислотними послідовностями). Встановлено високий відсоток гомології амінокислотних та нуклеотидних послідовностей українського ізоляту з новозеландським, польським та американським ізолятами, що вказує на те, що в Україну ХВХ потрапив з рослинами хости селекції однієї з цих країн.

6. Отримано повногеномну послідовність українського ізоляту Х-вірусу хости (6430 bp) та задепоновано в Ген Банк (GenBank: KX033798.1). Була виявлена мутація (AUG → UUG) у старт кодоні гена білка руху (ORF4), яка підтверджена повторним секвенуванням методом Сенгера. Порівняння повногеномних послідовностей ХВХ вказує на спорідненість українського та американського ізолятів Х-вірусу хости.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. First detection of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2012. – №62. – С. 48-50. (Здобувач брала участь в експериментальній частині роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).
2. Phylogenetic analysis of Hosta Virus X in Ukraine / Shchetynina G., Budzanivska I., Kharina A., Pereboychuk O. // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. – 2013. – №65. – С. 68-71. (Здобувач брала участь в експериментальній частині

- роботи, проаналізовані літературні джерела та результати досліджень).*
3. Серологічна діагностика Х вірусу Хости в рослинах роду *Hosta* tratt. / Щетиніна Г.С., Харіна А.В., Перебойчук О.П., Будзанівська І.Г. Агроекологічний журнал. – 2015. – №3. – С. 98-101. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).*
 4. Х - вірус хости – небезпечний рослинний патоген / Щетиніна Г.С., Косенко Ю.А., Будзанівська І.Г. // Карантин та захист рослин – 2016. – №1 – С.17-19.*(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).*
 5. The host range for Ukrainian isolate for hosta virus X (HVX) / G.A. Shchetynina, I.I. Prokopenko, I.G Budzanivska // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України, – 2016 – № 1 (58). – Режим доступу: http://nd.nubip.edu.ua/2016_1/4.pdf. *(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).*
 6. First report of Hosta virus X infecting hosta plants in Ukraine / Shchetynina A., Budzanivska I., Pereboychuk O., Somera M., Truve. E. // Acta virologica. – 2017 – № 61 – P: 498 – 499.*(Здобувачем проведени експериментальні дослідження за темою статті та проаналізовані результати досліджень).*
 7. Diagnostics of Hosta virus X in Ukraine/ Щетиніна Г.С., Харіна А.В., Будзанівська І.Г.// Вірусологія: минуле, сьогодення, майбутнє: 12 квітня 2012 р.: збірник тез. – К., 2012. – С. 85.
 8. Молекулярно біологічна характеристика Х-вірусу хости виділеного з колекції Національного ботанічного саду М.М. Гришка НАНУ / Щетиніна Г.С., Стахурська О.В., Харіна А.В., Будзанівська І.Г. // «Біоресурситавіруси»: VII Міжнародна конференція, 10-13 вересня 2013 р.: збірник тез. – К., 2013. – С. 102.
 9. Detection of Hosta virus X in Ukraine / Shchetynina A., Budzanivska I. // Global Virus Network conference of virologists for the Scandinavia-Baltic-Ukraine region: June 11th - 13th 2014.: Abstracts book. – E., 2014. – P. 145.
 10. Monitoring of Hosta virus X in Ukraine/ Shchetynina G., Kharina A., Budzanivska, Polishuk V. // 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology «Healthy plant – healthy people»: September 8 th -13 th, 2014.: Abstracts book. – С., 2014. – P. 228.
 11. Dynamics of spread of HVX in Hosta plants collection of Gryshko' National Botanical Garden / Shchetynina G., Pereboychuk O., Budzanivska I. // «Bioresources and viruses»: VIII Міжнародна конференція, 12-14 вересня 2016р.: збірник тез. – К., 2016. – С. 116-118.

АНОТАЦІЯ

Щетиніна Г.С. Молекулярно-біологічна характеристика нового для України Х-вірусу хости. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 – вірусологія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2017.

У роботі представлені результати п'ятирічного дослідження українського ізоляту Х-вірусу хости. В Україні у 2012 році вірус був виділений вперше. Детальне вивчення особливостей будови ХВХ дозволило створити якісну тест-систему для контролю посадкового матеріалу. Аналіз колекцій ботанічних садів міста Києва підтвердив ефективність отриманих діагностичних антитіл. Зокрема було показано високу динаміку поширення ХВХ в колекціях рослин хости. Було визначено здатність вірусу передаватись через насіння інфікованих рослин.

Вперше була отримана повногеномна послідовність українського ізоляту Х-вірусу хости, аналіз якої виявив мутацію (AUG → UUG) у старт-кодоні гена білка руху.

Ключові слова: Х-вірус хости, повногеномна послідовність вірусу, насіннева передача вірусу хости, мутація канонічного стартового кодону трансляції.

АННОТАЦІЯ

Щетинина А.С. Молекулярно-биологическая характеристика нового для Украины Х-вируса хосты. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 – вирусология. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2017.

В работе представлены результаты пятилетнего исследования украинского изолята Х-вируса хосты.

Образцы растений хосты с явными симптомами или без видимых симптомов были отобраны для первичной детекции. В результате ИФА диагностики с использованием Ат к ХВК из растений хосты сорта *Sum and Substance* был детектирован серологически родственный вирус. Для определения возбудителя данный образец использовали для ЭМ анализа и ОТ ПЦР. В результате электронно-микроскопического исследования были визуализированы вирусные частички с типичной морфологией для представителя рода *Potexvirus*. В результате обратно-транскрипционной ПЦР с специфической парой праймеров к участку белка оболочки ХВХ был получен ампликон соответствующей массы. Таким образом в Украине в 2012 году вирус был детектирован впервые.

Была получена специфическая антисыворотка к украинскому изоляту ХВХ. В дальнейшем была создана качественная тест-система для контроля посадочного материала. Анализ коллекций ботанических садов города Киева подтвердил эффективность полученных диагностических антител. В частности, было показано высокую динамику распространения ХВХ в коллекциях растений хосты НБСУ им. Н.Н. Гришка. Так же было определено отсутствие патогена в коллекции растений хост ботанического сада им. акад. А. В. Фомина Киевского национального университета им. Т. Шевченко. Была определена способность вируса передаваться через семена инфицированных растений.

Впервые была получена полногеномная последовательность украинского изолята Х-вируса хосты, анализ которой определил нетипическую мутацию в старт-кодоне ORF4. Это первое сообщение о таком типе замещения в ХВХ.

Ключевые слова: Х-вирус хосты, полногеномная последовательность, семенная передача, мутация канонического стартового кодона трансляции.

SUMMARY

Shchetynina G. S. Molecular-biological characteristics of Hosta Virus X, which is new for Ukraine. –Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, speciality 03.00.06 - virology. –Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2017.

Dissertation describes results of a five-year study of the Ukrainian isolate of Hosta Virus X.

Samples of hosta plants with visible symptoms or without visible symptoms were selected for primary detection. As a result of ELISA diagnostics using Ab for HVX from hosta plants of the Sum and Substance variety, a serologically related virus was detected. To determine the causative agent, this sample was used for the EM analysis and RT-PCR. As a result of electron microscopic examination, viral particles with typical morphology for a representative of the genus Potexvirus were found. As a result of a reverse transcription PCR with a specific primer pair to the coat protein of HVX, an amplicon of the 706 bp was obtained. Thus, for the first time the virus was detected in Ukraine in 2012.

A specific antiserum was obtained for the Ukrainian HVX isolate. Later, a high quality testing system was created to monitor the planting material. Analysis of collections of the Kiev botanical gardens confirmed the effectiveness of the obtained diagnostics antibodies. In particular, high dynamics of the HVX transmission was shown among collections of hosta plants of the M.M. Gryshko National Botanical Garden. It was also observed that the pathogen was absent in the hosta plant collection in the A.V. Fomin Botanical Garden named after Taras

Shevchenko. The virus transmission capacity by seeds of infected plants was ascertained.

Total RNA was extracted from plant material and a 706-bp fragment corresponding to nt position 5722–6448 in HVX-Kr was amplified in RT-PCR from the samples of 'Sum and Substance', 'Ultraviolet Light', 'Gold Standard', 'Halcyon', 'Great Expectations' and 'Crispula'.

All isolated RNA samples were pooled to synthesize a cDNA library for the next generation sequencing using TruSeq siRNA kit (Illumina) in order to identify all possible viruses. Sequencing was carried on HiSeq2500 rapid flow-cell with 50 bp single reads (Illumina). Reads were subsequently trimmed to remove kit-derived adaptor sequences using Fast X toolbox. De novo contig assembly was done using Oases 0.2.08. The assembled contigs were analysed using BLASTn program 2.2.28+. The ends of the HVX genome were verified by RACE using RNA purified from virus particles as a template.

The assembled sequence representing the complete genome of HVX-Ukr (Ukrainian isolate) was deposited in GenBank (KX033798). In complete genome ClustalO alignments, HVX-Ukr presented 99 % homology to HVX-37 and 97.5 % homology to HVX-Kr. Notably, HVX-Ukr genome 5' end showed some differences from other two isolates. Also, the region of movement protein start codon was additionally analysed by Sanger sequencing to confirm the presence of nonconventional start codon (UUG) previously identified in HVX-37 (U.S. isolate; JQ911698) but not in HVX-Kr (Korean isolate; AJ620114).

This is the first complete genome sequence of HVX isolate from Europe and the first evidence of HVX occurrence in Ukraine.

Key words: Hosta Virus X, genomic HVX sequence, HVX seed transmission, translation start codon mutation.