

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № ____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 2024 р.

Філогенетичний аналіз українських ізолятів вірусів яблуні родини *Betaflexaviridae*

Кваліфікаційна робота

магістра

денної форми навчання

за спеціальністю «Біологія»

Карпенка Олександра Олександровича

Робота виконана на кафедрі вірусології під керівництвом професора, д.б.н.
завідувача кафедри вірусології Будзанівської І. Г.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2024

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ASGV - Вірус борознистості деревини яблуні

ASPV - Вірус ямкуватості деревини яблуні

ACLSV - Вірус хлоротичної плямистості листя яблуні

NC - Нуклеокапсид

ORF - Відкрита рамка зчитування

Rep - Білок ініціюючий реплікацію

MP - Білок руху

CP - Капсидний білок

Mtr - Метилтрансфераза

Hel - Геліказа

RdRp - РНК-залежна РНК-полімераза

P-Pro - Папаїноподібні домени протеази

AlkB - База алкіляції

TGB - Потрійний генний блок

SgRNA - Одинарна направляюча РНК

DsRNA - Дволанцюгова РНК

UTR - Нетранслюючий регіон

(A)_n – polyA-послідовність

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ <i>BETAFLEXAVIRIDAE</i>	6
1.1 Загальна характеристика представників родини <i>Betaflexaviridae</i>	6
1.2 Організація геному. Філогенез і систематика.....	10
1.3 Характеристика членів родини <i>Betaflexaviridae</i> представлених на території України.....	15
1.3.1 Вірус борознистості деревини яблуні (ASGV).....	15
1.3.2 Вірус ямкуватості деревини яблуні (ASPV).....	18
1.3.3 Вірус хлоротичної плямистості листя яблуні (ACLSV).....	21
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	25
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ ..	28
3.1 Аналіз українського ізоляту ASGV.....	28
3.2 Аналіз українського ізоляту ASPV.....	36
3.3 Аналіз українського ізоляту ACLSV.....	44
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	55

ВСТУП

Betaflexiviridae - родина вірусів ряду *Tymovirales*, до якої входять 11 родів, які відрізняються між собою особливостями організації геному та природними шляхами передачі [1]. Географічні межі їх поширення дуже широкі, ізоляти були виявлені у більшості районів, де вирощують плодові культури [2, 3].

Всі представники родини *Betaflexaviridae* здатні передаватися шляхом механічного щеплення, хоча для деяких з них цей спосіб передачі ускладнений. Більшість з них не переносяться за допомогою векторів, однак відомо, що деякі представники триховірусів переносяться кліщами, а більшість карлавірусів в природних умовах здатні передаватися за допомогою попелиць [4].

Найчастіше їх ідентифікують з плодових дерев порядку розоцвіті, таких як яблуні, абрикоси, сливи, вишні та груші, хоча експериментальний спектр їх хазяїв значно ширший [5,6,7].

Серед представників родини *Betaflexaviridae* на території України циркулюють ізоляти вірусу борознистості деревини яблуні, вірусу ямкуватості деревини яблуні та вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні [8].

В плодових культур вони зазвичай викликають латентну інфекцію, проте у випадках коінфекції та в деяких сортів яблунь можуть розвиватись серйозні симптоми, такі як ямчастість або борознистість ксилеми, некроз флоєми, зменшення діаметра стовбура та навіть повне загнивання дерева, що призводить до зниження врожайності та завдає значних економічних збитків [9,10].

Враховуючи економічну значущість плодових культур як в Україні, так і у всьому світі важливо досліджувати шляхи потрапляння па

розповсюдження вірусних ізолятів до нашої країни для запобігання занесенню нових штамів.

Метою нашої роботи було проведення аналізу українських ізолятів вірусів яблуні родини Betaflexaviridae з використанням біоінформатичних методів дослідження .

В ході роботи були поставлені наступні завдання:

- 1.Відбір з бази даних NCBI нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусів ASGV, ASPV та ACLSV.
- 2.Філогенетичний аналіз відібраних послідовностей.
- 3.Дослідження часу дивергенції українських ізолятів від ізолятів з інших країн;
- 4.Проведення рекомбінаційного аналізу для встановлення механізмів еволюції українських ізолятів вірусів яблуні.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ *BETAFLLEXAVIRIDAE*

1.1 Загальна характеристика представників родини *Betaflexaviridae*

Betaflexiviridae - родина вірусів ряду *Tymovirales*, до якої входять 11 родів, які відрізняються між собою особливостями організації геному та природними шляхами передачі [1].

Найчастіше їх ідентифікують з плодових дерев порядку розоцвіті, таких як яблуні, абрикоси, сливи, вишні та груші, хоча природній спектр їх хазяїв значно ширший. В плодових культур вони зазвичай викликають латентну інфекцію, що призводить до зниження врожайності та значних економічних збитків [10].

Віріони представників родини *Betaflexiviridae* мають гнучку ниткоподібну форму (**Рис.1**). Їх діаметр зазвичай становить 12–13 нм (діапазон 10–15 нм), довжина від 600 до понад 1000 нм, що залежить від роду вірусу. Тип симетрії - спіральний з кроком приблизно в 3,4 нм (діапазон 3,3–3,7 нм).

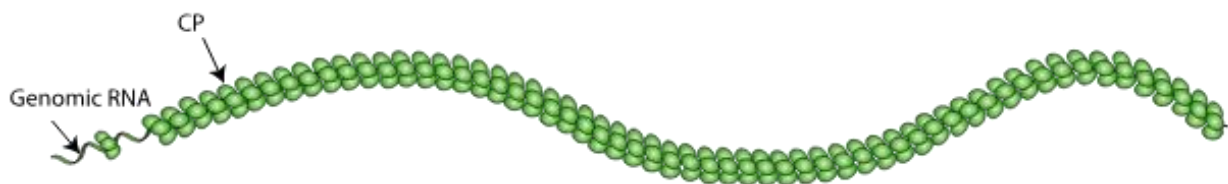


Рис. 1 Схематичне зображення віріону представника родини *Betaflexiviridae* [1].

В деяких представників родини присутні чітко виражені перехресні лінії, та ряд реплікаційних білків, що за своєю будовою подібні до білків альфавірусів.

Седиментація віріонів відбувається у вигляді окремих (іноді двох дуже близьких) смуг із S20, w 92–176S. Цей показник залежить від роду вірусу.

Віріони містять одну молекулу лінійної одноланцюгової РНК, розміром приблизно 5,9–9,0 кб, що становить 5–6% від їх загальної маси. РНК обмежена на 5'-кінці m⁷G та має поліаденільований тракт на 3'-кінці.

Деякі з представників роду *Carlavirus* мають два субгеноми РНК розміром 2,1–3,3 та 1,3–1,6 кб, які, можливо, інкапсульовані в короткі частинки.

Вірусний капсид усіх членів родини складається з одного поліпептиду розміром від 18 до 44 кДа. Про вміст вуглеводів та ліпідів в віріонах не повідомлялось.

Біологічні характеристики

В природніх умовах віруси даної родини мають дуже широкий спектр хазяїв. Виняток становлять більшість представників роду *Carlavirus*, які переважно або виключно інфікують дерева [11].

В більшості випадків після проникнення в клітину віріони чинять незначний вплив на рослину-хазяїна та викликають помірно виражену симптоматику. Часто хвороба протікає у формі латентної інфекції.

Виражена симптоматика, така як системна жовта мозаїка, хлоротична плямистість, пожовтіння прожилок листя можуть спостерігатись в окремих випадках, наприклад при коінфекції різними штамами вірусів, або уражені чутливих рослин (**Рис. 2**).



Рис. 2 Змішана інфекція на листях яблуні викликана коінфекцією вірусів ASGV, ASPV та ACLSV [12].

Всі представники родини *Betaflexaviridae* здатні передаватися шляхом механічного щеплення, хоча для деяких з них цей спосіб передачі ускладнений. Більшість з них не переносяться за допомогою векторів, однак відомо, що деякі представники триховірусів переносяться кліщами, а більшість карлавірусів в природніх умовах здатні передаватись за допомогою попелиць. Для вітівірусів було описано ряд наступних переносників: псевдококові борошністі червці, щитівки та попелиці [4].

Після ураженням вірусом клітини-хазяїна в цитоплазмі ураженої клітини накопичуються агрегати вірусних частинок. Деякі з представників карлавірусів індують утворення включень яйцеподібної або неправильної форми. Можливе виникнення і інших змін, таких як дезорганізація хлоропластів, але зазвичай характерні специфічні цитопатичні структури зазвичай відсутні.

Видові та родові критерії розмежування в родині

В родині *Betaflexaviridae* різні роди (Табл.1) відрізняються особливостями організації геному та природними шляхами передачі.

У кожному сімействі представлені ізоляти різних видів, які мають приблизно 72% ідентичності між відповідними генами їх капсидних білків (СР) або полімерази. Відсоток ідентичності в генах вірусів з різних родів зазвичай становить менш ніж 45%.

Табл. 1 Відмінні властивості різних родів *Betaflexiviridae* [4]

(ORFs - відкриті рамки зчитування, Rep - білок ініціюючий реплікацію, MP - Білок руху, CP - капсидний білок).

Рід	Довжина віріона(нм)	ORFs	Rep	MP	CP
<i>Capillovirus</i>	640–700	2	210–245	30К	25–27
<i>Carlavirus</i>	610–700	6	215–225	TGB	32–36
<i>Citrivirus</i>	960	3	227	30К	41
<i>Foveavirus</i>	800+	5	230–250	TGB	28–44
<i>Trichovirus</i>	640–890	3 або 4	215–220	30К	21–24
<i>Vitivirus</i>	725–785	5	190–200	30К	18–22

Віріони у представників роду *Carlavirus*, мають високу імуногенність але у представників інших родів виявлені лише помірні або слабкі антигени. У межах (але зазвичай не між) родами деякі віруси є серологічно спорідненими.

1.2 Організація геному. Філогенез і систематика

Організація геному

В представників родини *Betaflexaviridae* кількість генів становить від двох до шести в залежності від роду (Табл.1), але в усіх видів, продукт кодований ORF1, який слідує за короткою послідовністю 5'-UTR є гомологічним полімеразним білкам «альфавірусоподібної» супергрупи РНК-вірусів. (Рис.3)

Цей білок (190–250 кДа) містить консервативні домени для активності метилтрансферази (Mtr), гелікази (Hel) і РНК-залежної РНК-полімерази (RdRp). Більшість членів родини також мають AlkB і папаїноподібні домени протеази (P-Pro) між метилтрансферазою та геліказою.

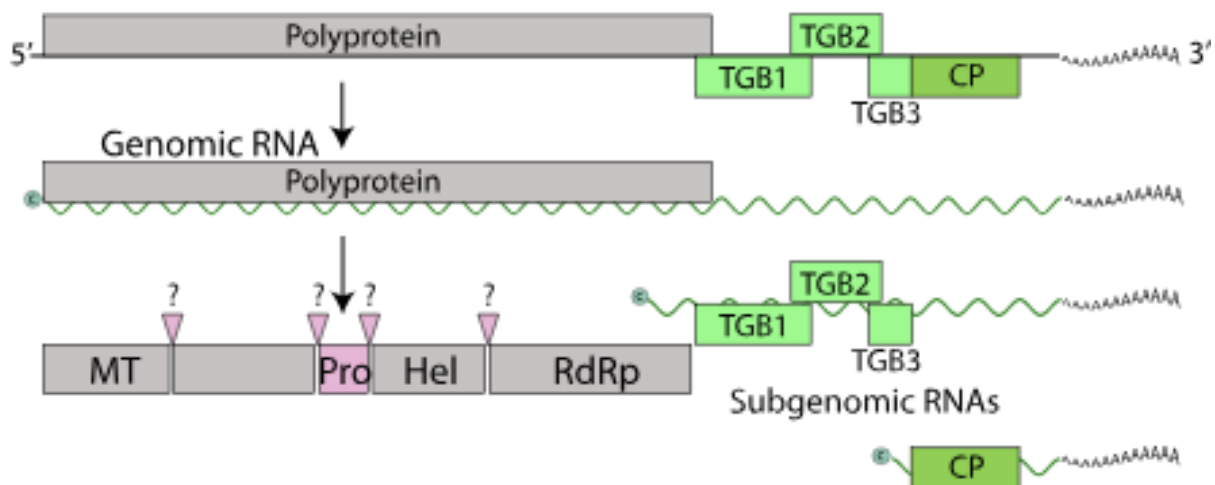


Рис.3 Структура геному *Potato virus X* [1].

Менші ORF кодують білки залучені у переміщенні від клітини до клітини або окремий білок руху із «надродини», до якої входять віруси: *Capillovirus*, *Citrivirus*, *Trichovirus* та *Vitivirus*. Зазвичай вони розташовані після 3'-проксимального кінця полімерази, але в геномі капіловірусу (Рис.4) білок руху ORF2 вкладений в ORF1, а у вітівірусів додаткова відкрита рамка зчитування присутня між полімеразою та MP генів.

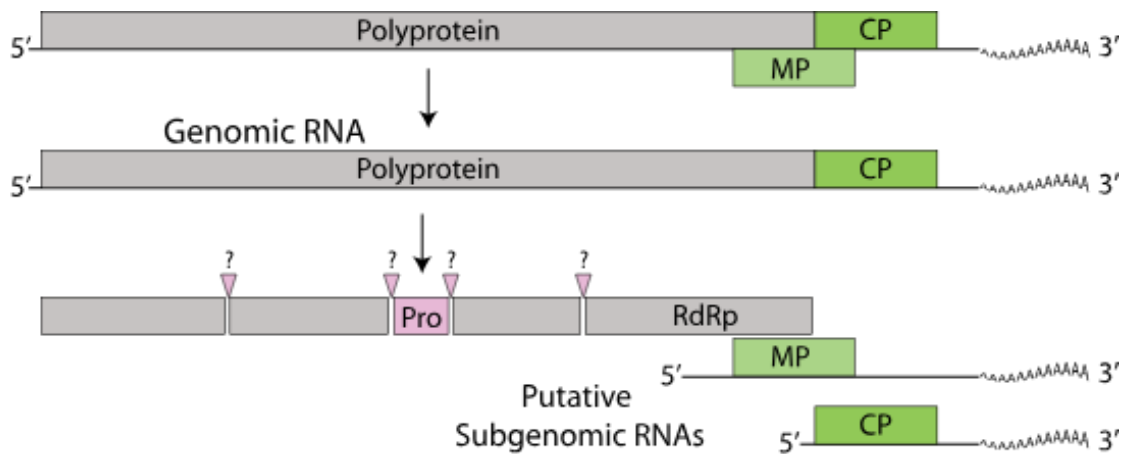


Рис. 4 Структура геному *Capillovirus* [1].

Ген CP завжди слідує за MP(s), при цьому в деяких родин, таких як *Carlavirus*, *Vitivirus* та *Trichovirus* кінцева відкрита рамка зчитування кодує білок із зв'язуючим мотивом типу цинкового пальця, що здатен зв'язувати нуклеїнові кислоти. На прикладі вітівірусів було показано, що цей невеликий білок має супресор сайленсингу діяльності РНК.

Відкрита рамка зчитування знаходиться нижче від полімерази та транслюються з 3'-кінцевих sgRNA, які часто виявляються в інфікованих тканинах. У деяких вірусів, зокрема в представників з родин *Citrivirus*, *Vitivirus* і *Trichovirus* можна виявити, вкладені набори 5'-кінцевих sgRNA і пов'язаної з ними двуланцюгової РНК.

Філогенез і систематика

Загалом представники родини *Betaflexaviridae* розділяються на дві основні групи, які відповідають типам їх білків руху.

При проведенні філогенетичного аналізу за білком реплікації (був обраний один репрезентативний ізолят з кожного секвенованого виду в родині) більшість родів мають розгалуження з високим ступенем спорідненості. (Рис. 5)

Carlavirus і *Foveavirus* з низкою невизначених видів, які мають форму TGB в одній з гілок, тоді як решта родів і вірусів (усі з яких мають білок руху типу «30К») також групуються разом.

Очікується, що членом нового роду *Terovirus* стане наразі неklasифікований *Potato virus T*. Решта неklasифікованих видів нагадують за своєю організацією геному фовеавіруси, але не утворюють окрему монофілетичну групу.

На (Рис.6) зображено філогенетичне дерево, яке демонструє, як міжклітинні білки руху вірусів сімейства *Betaflexiviridae* пов'язані з аналогічними білками інших вірусів рослин.

Дерево (а) побудовано на основі вирівняних за кодонами нуклеотидних послідовностей першого білка потрійного генного блоку.

Дерево (b) побудовано на основі амінокислотних послідовностей 30К-подібного білка руху.

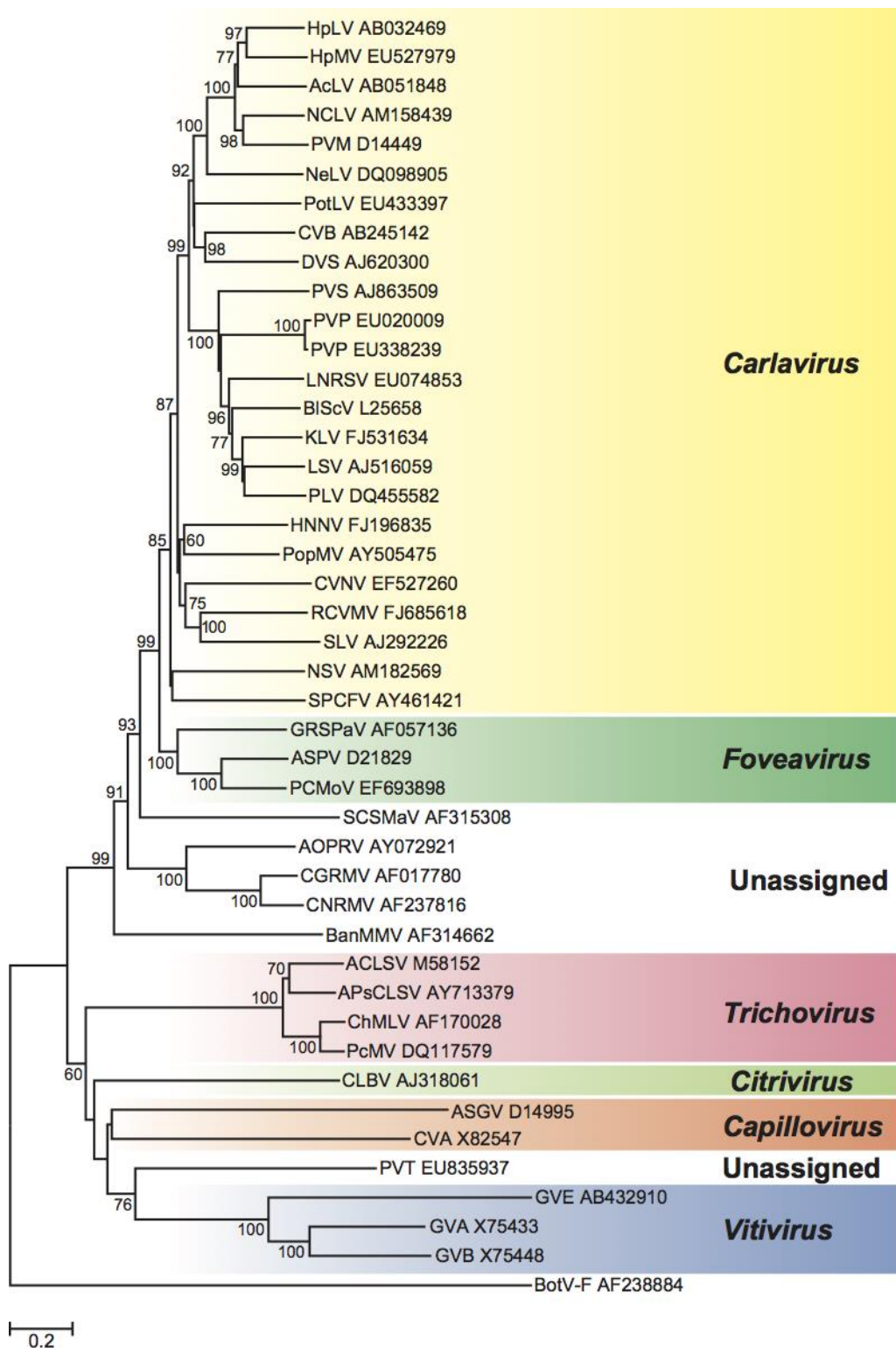


Рис. 5 Філогенетичне дерево на основі амінокислотних послідовностей білка реплікації членів родини *Betaflexiviridae* [4].

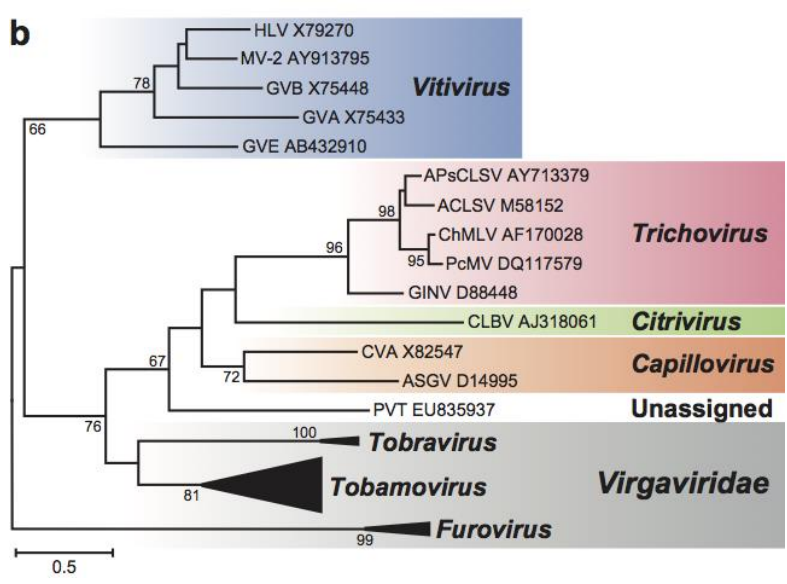
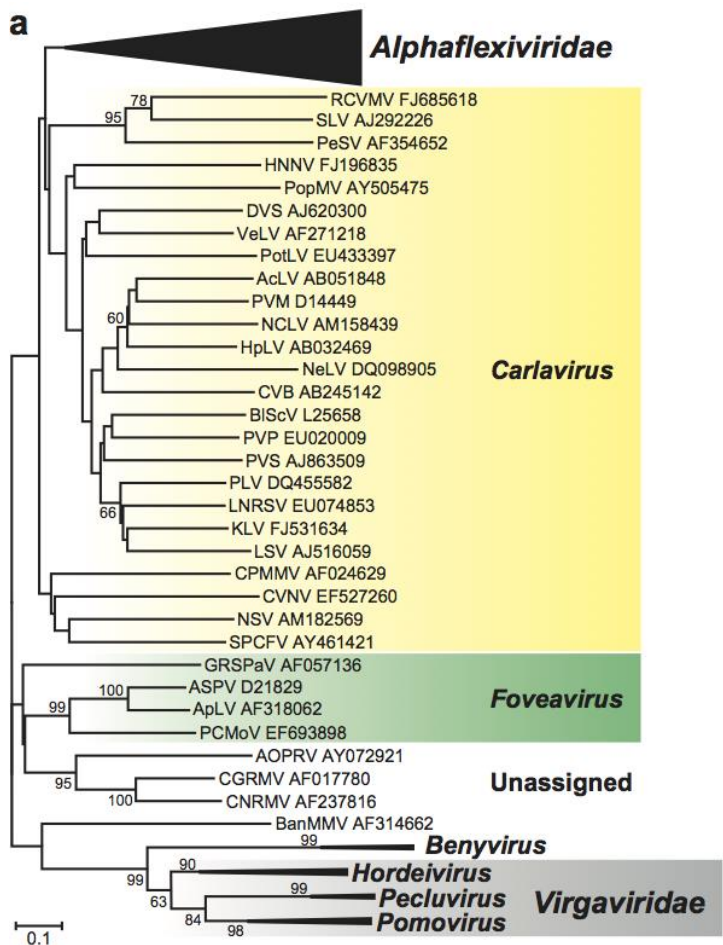


Рис. 6 Філогенетичне дерево, яке демонструє, як міжклітинні білки руху вірусів родини *Betaflexiviridae* пов'язані з аналогічними білками інших вірусів рослин [4].

1.3 Характеристика членів родини *Betaflexaviridae* представлених на території України

1.3.1 Характеристика вірусу борознистості деревини яблуні

Вірус борознистості деревини яблуні (ASGV) є типовим видом роду *Capillovirus*, підродини *Trivirinae*, родини *Betaflexiviridae* [13]. Вперше був виділений з *Malus sylvestris* в 1965 році [14].

Віріони ASGV здатні передаватись шляхом щеплення та механічної інокуляції, для деяких видів повідомлялось про можливість передачі через насіння [15].

Вектори, які здатні переносити ASGV не виявлені. Географічні межі поширення ASGV дуже широкі. Його ізоляти були виявлені у більшості районів, де вирощують яблука [2].

ASGV має широкий спектр хазяїв [7,16,17], але найчастіше його виділяють з фруктових дерев порядку розоцвіті, таких як яблуні, абрикоси, вишні та груші [18]. При цьому в деяких сортів яблунь внаслідок інфекції можуть виникати серйозні симптоми (при коінфекції спостерігаються більш виражені симптоми) (Рис.7), такі як ямчастість та борознистість ксилеми, некроз флоєми, зменшення діаметра стовбура та навіть повне загнивання дерева, що значно знижує їх продуктивність або веде до загибелі дерева [9].

Також ASGV здатен викликати хвороби в різних сортів цитрусових, включаючи хворобу рваності листя [19,20].

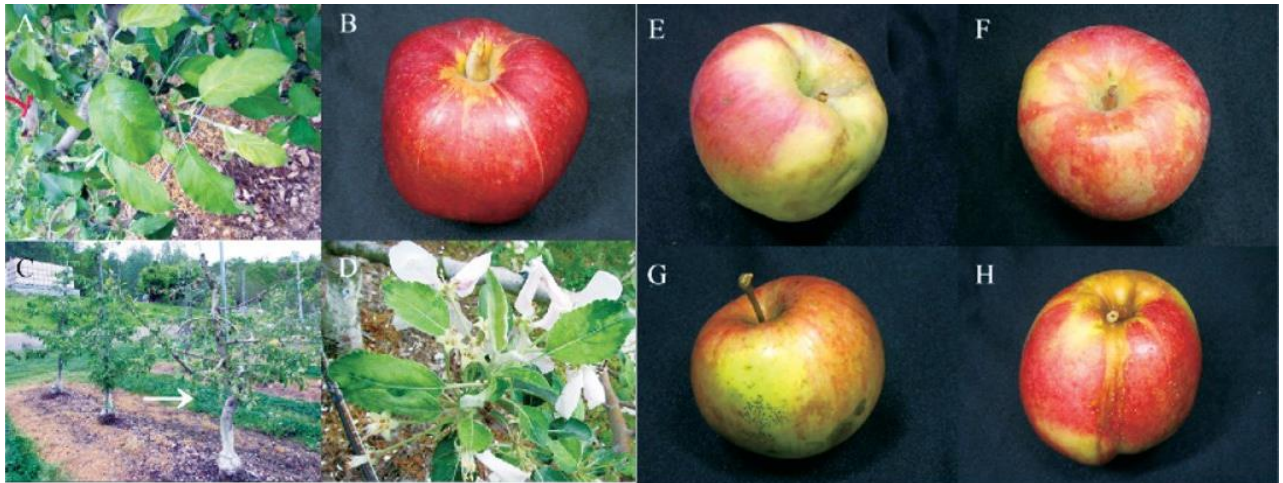


Рис. 7. Інфіковане ASGV листя (D) та плоди (E, F, G і H). Коінфекція вірусами ASGV та ACLSV листя (A) і плодів (B) [21].

Віріони ASGV гнучкі, мають ниткоподібну форму (**Рис.8**). Їх довжина становить 640-700 нм, діаметр 12 нм. Побудовані із спіралью розташованих білкових субодиниць з кроком 3,4 нм та вираженою поперечною смугою. Кожен з витків містить у собі 9 або 10 субодиниць. Кожен з них складається з одного білка 24–27 кДа та містить лінійну позитивну одноланцюгову РНК розміром 6,5–7,4 кб, що становить близько 5% від маси віріона. РНК поліаденільована на 3'-кінці.

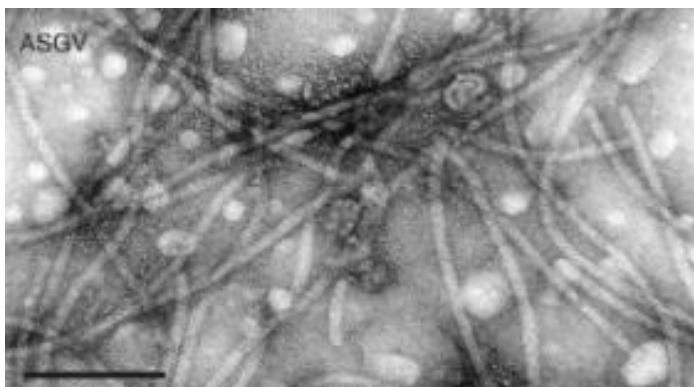


Рис. 8 Електронна мікрофотографія вірусу ASGV (шкала відображає 100 нм) [22]

Ізоляти виду ASGV від різних хазяїв показують широкую варіабельність в послідовності 284 амінокислотної ділянки білка,

кодованого ORF1, яка знаходиться між доменами полімерази та капсидного білка [23,24].

Геном ASGV (**Рис.9**) має дві відкриті рамки зчитування [25,26]. ORF1 охоплює більшу частину геному, за винятком кінців, і кодує велику репліказу поліпротеїну (241 кДа) і 3'-термінальний CP (27 кДа), який експресується субгеномною РНК [27].

ORF1 кодує білок 240–266 кДа, за яким слідує нетранслююча ділянка. Перед хвостом 3'-poly(A). ORF2 вкладено в ORF1 біля його 3'-кінця що кодує білок 36–52 кДа.

Пошук у базі даних Pfam із послідовністю поліпротеїну реплікази показує, що вона кодує від N- до С-кінця вірусну метилтрансферазу, папаїноподібну протеазу, вірусну геліказу суперродини 1 і РНК-залежну РНК -полімеразу.

Apple stem grooving virus, ASGV (6,495 nts)

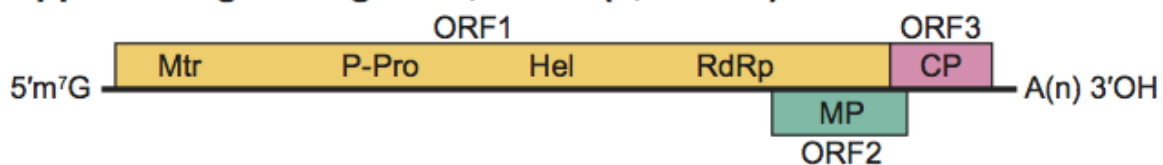


Рис.9 Організація генома ASGV [4]. Зображено відносно розташування ORF та продуктів їх експресії (Mtr – метилтрансфераза, P-Pro - папаїноподібна протеаза, Hel – геліказа, Rep- білок ініціюючий реплікацію, CP – капсидний білок, (A)_n – polyA-послідовності, ORF – відкрита рамка зчитування, RdRP- РНК-залежна РНК -полімераза)

Також в геномі присутні дві дуже варіабельні області [26,28]. Менша з них знаходиться в області 1590–1710 між вірусною метилтрансферазою та геліказою; більша в проміжку 4749–5604 між доменами РНК-залежної РНК-полімерази та капсидного білку.

Отже, підсумовуючи, геном має п'ять областей; ділянка 1 кодує вірусну метилтрансферазу, коротка ділянка 2 є варіабельною, її функція ще не досліджена, ділянка 3 кодує папаїноподібну ендопептидазу, геліказу та РНК-залежну РНК-полімеразу, ділянка 4а є другою варіабельною ділянкою та кодує «поліпротеїновий лінкерний домен» [29], який повністю перекриває область 4b в ORF2, а ORF 1 завершується областю 5, яка представляє собою ген капидного білку.

1.3.2 Характеристика вірусу ямкуватості деревини яблуні ASPV

Вірус ямкуватості деревини яблуні є типовим видом роду *Foveavirus*, сімейства *Betaflexiviridae* в порядку *Tymovirales* [30]. Вперше він був виявлений у *Malus sylvestris* в 1950-х роках в США [31]. В основному його ідентифікують при дослідженні плодових культур, таких як яблуні, груші, айва та сливи.

Передається шляхом механічної інокуляції. На даний час про комах-векторів, які здатні переносити ASPV не повідомлялось.

Викликана ним інфекція зазвичай протікає безсимптомно [32], однак у чутливих рослин, або у випадках коінфекції з ASGV та ACLSV можуть проявлятися такі симптоми як: пожовтіння жилок листя, локальні некротичні ураження та червона плямистість, що призводить до значного зниження якості та кількості плодів [12].

Деякі симптоми, які викликає ASPV є характерними та проявляються, наприклад, у вигляді наростів на рослинах-індикаторах, таких як *Malus pumila* 'Spu 227' (Рис.10)

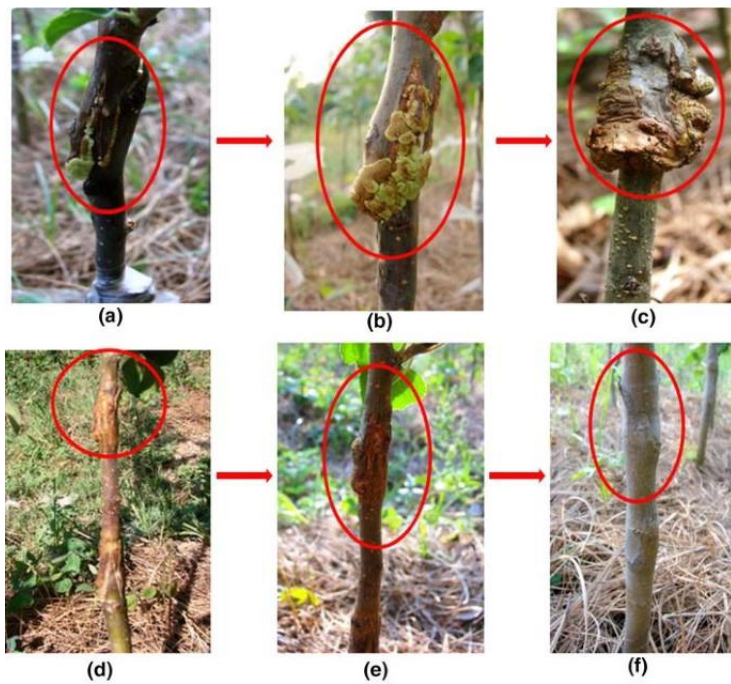


Рис.10 Нарости викликані ASPV внаслідок ураження рослини-індикатора *Malus pumila* 'Spy 227' [33].

Віріони ASPV (Рис.11) ниткоподібні, гнучкі, не мають суперкапсиду. Довжина віріонів складає близько 800 нм, діаметр 12-15нм. Тип симетрії - спіральний. Віріон містить один структурний білок розміром 44 кДа, та 4 неструктурних білки розмірами 247, 25, 13, 7 кДа. Про вміст ліпідів та вуглеводів не повідомлялось [34].

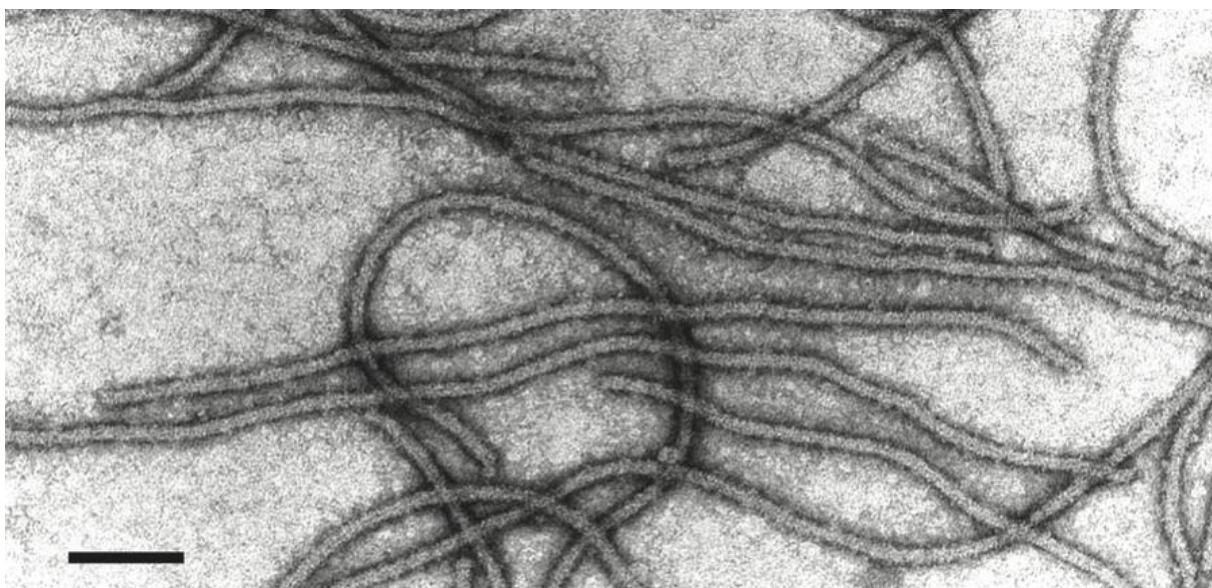


Рис. 11 Негативно-контрастна електронна мікрофотографія ізолятів вірусу ASPV (шкала відображає 100 нм) [35].

Геном ASPV (Рис. 11) представлений позитивною одноланцюговою РНК та складається з приблизно 9300 нуклеотидів в довжину. Містить 5 відкритих рамок зчитування (ORF1–5), 5' і 3' нетранслюючих регіонів, а також дві короткі міжгенні некодуєчі області, які розташовані між ORF1 і ORF2 та ORF4 і ORF5. ORF1 кодує поліпротеїн вірусної реплікази, ORF2–4 кодують потрійний генний блок білків, а ORF5 кодує капсидний білок оболонки вірусу [36].

Apple stem pitting virus, ASPV (9,306 nts)

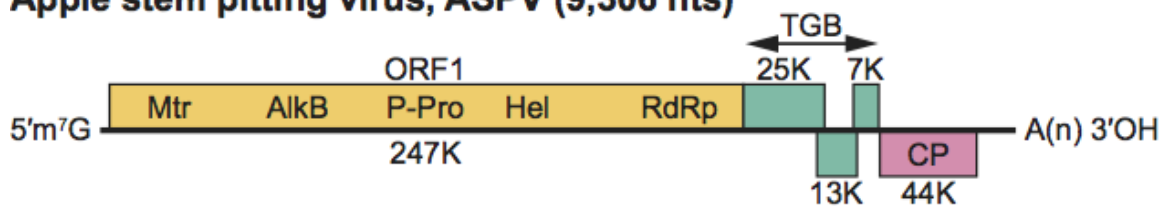


Рис.11 Організація геному ASPV [4]. Зображено відносно розташування ORF та продуктів їх експресії. (Mtr – метилтрансфераза, P-Pro - папаїн-подібна протеаза, Hel – хеліказа, Rep- регіон реплікації, CP – капсидний білок, (A)_n – polyA-послідовності, ORF – відкрита рамка зчитування, RdRP- РНК-залежна РНК -полімераза).

1.3.3 Характеристика вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні

Вірус хлоротичної плямистості яблуні (ACLSV) належить до роду *Trichovirus* родини *Flexiviridae* [37].

В природніх умовах ACLSV уражує більшість видів фруктових дерев (найчастіше яблуні, персики, сливи та вишні) серед яких багато комерційних сортів. Експериментальний діапазон хазяїв дещо ширший [38].

У природних хазяїв після ураження ACLSV можна спостерігати незначну кількість симптомів захворювання. При інфекції виникає крапчастість, відставання в рості, плямистість та спотворення форми листка (Рис.12).

У деяких випадках інфекція протікає латентно і видимі симптоми не виникають взагалі.



Рис. 12 Характерні симптоми ураження ACLSV [39].

Інфіковані клітини різною мірою пошкоджуються ACLSV. Віріони знаходяться в клітинах флоєми і паренхіми листя і коренів і накопичуються

в цитоплазмі, іноді в ядрі та мають форму пучків або паракристалічних агрегатів. Тільця включення не утворюються.

Вірус легко передається шляхом механічної інокуляції, при щепленні або з посадковим матеріалом. Про передачу вірусу при контакті ураженої та здорової рослин, а також через насіння та пилок не повідомлялось. Вектори передачі ще не виявлені або взагалі відсутні.

За своєю морфологією віріони ACLSV складаються з одного поліпептиду 20,5–27 кДа. Мають ниткоподібну форму (**Рис.13**), дуже гнучкі. Розмір віріонів в довжину становить 640-890 нм; діаметр від 10 до 12 нм. Тип симетрії-спіральної з кроком в 3,3–3,5 нм. На один виток спіралі припадає 10 субодиниць.

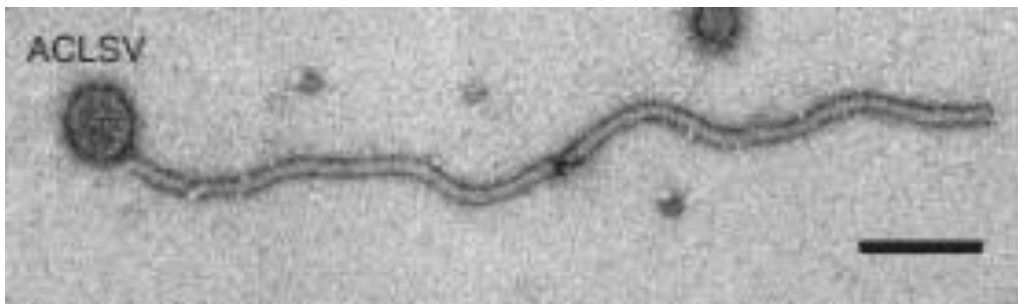


Рис.13 Електронна мікрофотографія частинок ізоляту виду ACLSV.

З використанням негативного контрастування. Шкала 100 нм. [40].

Віріони містять одну молекулу лінійної позитивної одноланцюгової РНК розміром приблизно 7,5–8,0 кб з поліаденільованим 3'-кінцем, що становить близько 5% від маси частинок. Є припущення, які свідчать про те, що геномна РНК ACLSV закрита на 5'-кінці m7G.

Ізоляти ACLSV демонструють високу варіабельність їхньої нуклеотидної послідовності. Загальна ідентичність лежить в межах між 76 і 82%. Білок нуклеокапсиду є найбільш консервативним білком (87–93%

ідентичності). При цьому розбіжність в області МР доволі висока (77–85% ідентичності) [41].

При седиментації віріони осідають у вигляді однієї або двох дуже близьких між собою смуг із S20,w приблизно 100S. Відмічається чутливість віріонів до рибонуклеаз.

Віріони всіх вірусів роду стійкі до помірно високих температур (термічна інактивація відбувається при температурі близько 55–60°C), помірно стійкі до органічних розчинників.

Геном ACLSV (**Рис.14**) містить відкриті рамки зчитування, які частково перекриваються між собою. Додаткова ORF присутня на 3' кінці. Велика відкрита рамка зчитування зі сторони 5' безпосередньо експресується з геномної РНК, в той час як дві менші ORF, які відповідно кодуєть МР і СР через sgRNA.

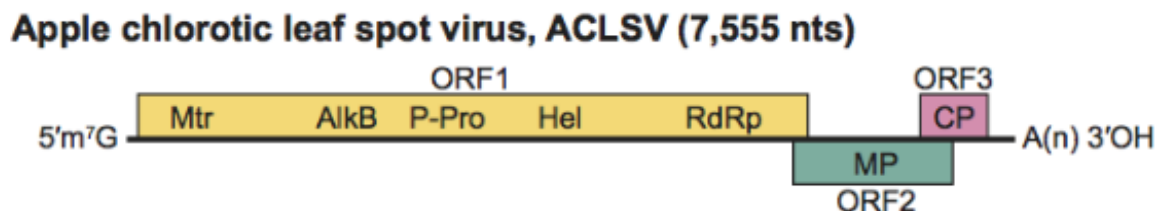


Рис.14 Організація геному ACLSV. Зображено відносно розташування ORF та продуктів їх експресії [4]. (Mtr – метилтрансфераза, P-Pro - папаїн-подібна протеаза, Hel – хеліказа, Rep- регіон реплікації, CP – капсидний білок, (A)_n – polyA-послідовності, ORF – відкрита рамка зчитування, RdRP-РНК-залежна РНК -полімераза)

Тканини, інфіковані ACLSV, містять шість видів дволанцюгової РНК приблизно 7,5, 6,4, 5,4, 2,2, 1,1 і 1,0 Кб. Вид 7,5kbp представляє собою

дволанцюгову форму повнорозмірного геному, тоді як види 2.2 та 1.1kbp є дволанцюговими формами sgRNA, що кодують білок руху та капсидний білки відповідно.

Найбільш поширені види дволанцюгової РНК функція яких досі невідома, є 5'-кінцевими разом з геномною РНК і мають розміри 6,4 і 5,4 кб, відповідно. Вважається, що реплікація є цитоплазматичною і включає продукт трансляції ORF1.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Об'єкти дослідження

Об'єктами дослідження були нуклеотидні послідовності українських та зарубіжних ізолятів вірусів: ASGV, ASPV та ACLSV.

2.2 Методи досліджень

Використовуючи BLAST - аналіз [42] в міжнародних базах даних були знайдені раніше секвеновані послідовності капсидних білків українських ізолятів вірусів ASPV, ASGV та ACLSV.

Після цього було проведено BLAST аналіз з базовими налаштуваннями для пошуку подібних послідовностей та подальшої роботи з ними. Для ASGV було знайдено та завантажено 520 сиквенсів, для ASPV 424, для ACLSV 729 сиквенсів.

В подальшому із завантажених сиквенсів було відібрано 50 послідовностей ізолятів для ASGV, 47 послідовностей для ACLSV та 49 послідовностей для ASPV; детальну інформацію про кожен з сиквенсів було занесено до таблиць.

Відібрані послідовності становлять репрезентативну вибірку, так як відбір зразків з яких вони були виділені та секвеновані відбувався в різні роки з географічно віддалених між собою регіонів.

Наступним етапом роботи було вирівнювання відібраних на попередньому етапі послідовностей з використанням програми MEGA 11, за допомогою вбудованого алгоритму ClustalW.

Проведення аналізу для пошуку рекомбінаційних подій відбувалось за допомогою пакету програм RDP4. Для цього використовувались вбудовані в програму методи RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN, LARD, 3SEQ, Distance Plot і TOPAL. При проведенні

аналізу рекомбінаційних подій використовувались встановлені за замовчуванням налаштування.

Для побудови та візуалізації матриць теплової ідентичності за фрагментом нуклеокапсиду вірусів для ASPV, ASGV та ACLSV з відповідними послідовностями ізолятів з інших країн використовувались інструменти інтегровані в пакет програм RDP4.

При проведені філогенетичних досліджень з залученням методу молекулярного годинника використовувалися пакети програм BEAST та BEAUti [43].

Використання вищевказаних пакетів програм допомогло розрахувати та візуалізувати філогенетичні відносини між ізолятами беручи до уваги час відбору зразків.

Алгоритм дій був наступний: попередньо відредаговані та вирівняні в програмі MEGA11 нуклеотидні послідовності в форматі .fasta були експортовані в програму BEAUti.

Використовуючи програму BEAUti, отримані файли було використано для генерації XML файлів (частина параметрів та моделей були обрані таким чином, щоб точніше проаналізувати саме вірусні послідовності), інші налаштування було залишено за замовчуванням.

Отримані таким чином XML файли були опрацьовані в програмі BEAST, яка згенерувала необхідні для подальшої роботи файли з розширенням .trees. З побудованих дерев були обрані ті, що мають високу степінь достовірності.

Візуалізація та подальша робота з деревами проводилась за допомогою пакету програм FigTree [44].

2.3 Статистична обробка даних

Для статистичної обробки в ході побудови філогенетичних дерев використовувався бутстреп аналіз.

В разі використання бутстрепінгу встановлювалось значення в 500 раундів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Аналіз українського ізоляту ASGV

На першому етапі роботи за допомогою програми BLAST була проаналізована нуклеотидна послідовність капсидного білка українського ізоляту ASGV (код доступу GenBank FJ752496). Перші 10 послідовностей отримані в результаті пошуку представлені на (Рис.15)

Усього за результатами пошуку в базі даних GenBank було знайдено 520 послідовностей ASGV з різних країн. Для проведення подальшого дослідження було відібрано 50 послідовностей, які відрізнялись між собою як часом відбору зразків так і країною походження (Табл.2)

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Apple stem grooving virus coat protein gene, partial cds	Apple stem...	704	704	100%	0.0	100.00%	381	FJ752496.1
✓	Apple stem grooving virus isolate ASGV_T, complete genome	Apple stem...	682	682	100%	0.0	98.95%	6470	OR640152.1
✓	Apple stem grooving virus isolate BR-Gala1, complete genome	Apple stem...	676	676	100%	0.0	98.69%	6470	MK923757.1
✓	Apple stem grooving virus isolate ASGV/FT146 polyprotein gene, partial cds	Apple stem...	676	676	100%	0.0	98.69%	2211	MW322833.1
✓	Apple stem grooving virus isolate 13TF178, complete genome	Apple stem...	675	675	100%	0.0	98.69%	6492	MZ126541.1
✓	Apple stem grooving virus isolate 13TF177, complete genome	Apple stem...	675	675	100%	0.0	98.69%	6482	MZ126540.1
✓	Apple stem grooving virus isolate DSMZ PV-0199, complete genome	Apple stem...	675	675	100%	0.0	98.69%	6496	MW582790.1
✓	Apple stem grooving virus isolate AC, complete genome	Apple stem...	675	675	100%	0.0	98.69%	6496	JX080201.1
✓	Apple stem grooving virus isolate Gala-BJ, complete genome	Apple stem...	671	671	100%	0.0	98.43%	6487	OP535346.1
✓	Apple stem grooving virus isolate 13TF201, complete genome	Apple stem...	671	671	100%	0.0	98.43%	6488	MZ126543.1

Рис.15 – Результат BLAST аналізу послідовності фрагменту капсидного білка українського ізоляту ASGV. Зображено перші 10 результатів.

Обраний фрагмент CP українського ізоляту має найвищу степінь спорідненості до ізолятів (ASGV_T, BR-Gala1, ASGV/FT146, 13TF178, 13TF177). Країни походження ізолятів: Туреччина, Бразилія, США, Канада (2 зразки). Відсоток ідентичності дуже високий та становить (98,69-98,95%).

Табл.2 Основна інформація про відібрані послідовності ізолятів ASGV.

Код доступу GenBank	Ізолят	Хазяїн	Країна походження	Рік відбору зразку
---------------------	--------	--------	-------------------	--------------------

FJ752496	ASGV	Malus domestica	Україна	2008
OR640152	ASGV_T	Malus domestica	Туреччина	2022
MK923757	BR-Gala1	Malus domestica cv. Gala	Бразилія	2005
MW322833	ASGV/FT146	Malus sp.	США	2018
MZ126541	13TF178	Malus domestica	Канада	2013
JX080201	AC	Malus x domestica	Німеччина	2009
OP535346	Gala-BJ	Malus domestica cv. Gala	Бразилія	2022
HE978837	ASGV	Malus x domestica cv. Red Chief	Індія	2011
LC783378	ASGV CNU-HR	Malus domestica	Південна Корея	2021
MK481981	Heilongjiang-1	Malus domestica	Китай	2019
Mz291917	19SP002	Malus domestica	Канада	2019
MZ126540	13TF177	Malus domestica	Канада	2021
MW592375	JG1	Malus domestica	Китай	2020
OR496517	Geochang	Cnidium officinale	Південна Корея	2022
LC480456	BH-Cnidium	Cnidium officinale	Південна Корея	2018
MN786531	ASGV/OS/CI TH	Malus domestica	Індія	2019
LC143387	FKSS2	Citrus junos	Японія	2014

LT574881	ASGV iso9_WILD	Malus domestica	Чехія	2016
AB004063	Li-23	apple	Японія	1997
LN627002	Ap-SK	Malus domestica, cultivar Starkrimson	Індія	2014
MF616381	JLSG	Malus asiatica	Китай	2016
KP025665	HH1-1	Citrus sinensis	Китай	2006
MZ126535	13TF161B	Malus domestica	Канада	2013
NC_001749	ASGV	Malus domestica	Японія	1993
JQ308181	ASGV-CHN	Malus domestica	Китай	2011
MK481987	Beijing-1	Malus domestica	Китай	2019
MK929792	BR-Brae1	Malus domestica cv. Braeburn	Бразилія	2005
KX686111	M220	Malus domestica cv. Fuji	Бразилія	2014
LT160740	HPKu-2	Malus domestica	Індія	2016
KU947036	ASGV-HT	Malus sp. crabapple	Китай	2015
MK354036	X4	Malus domestica	Іран	2018
MK354035	SS4	Malus domestica	Іран	2018
FN599521	Palampur	Malus x domestica cv.Red Chief	Індія	2009

OQ263371	K	Malus domestica cv. Red Delicious	Іран	2021
FJ952163	19serASG	Malus domestica cv. Granny Starking	Сербія	2009
FJ952160	A6ASG	Malus domestica	Індія	2009
GU250886	NZ	Malus domestica	Нова Зеландія	2002
KX224100	ASGV-Eth1	Malus pumila	Ефіопія	2015
HQ646050	LV-m205	Malus domestica	Латвія	2011
KP994216	Sch_RedCr-1	Malus x domestica	Білорусь	2014
LT882719	G171	Malus domestica cv. Golden	Туніс	2017
JQ866625	ASGV-46	Pyrus	Україна	2011
JQ866624	ASGV-44	Pyrus	Україна	2011
MN861411	Pak-AT-CB7	Prunus armeniaca	Пакістан	2018
ON746135	MP1	Malus cv. prunifolia	Південна Корея	2022
OM313345	HB-Pb2-11S	Pyrus betulifolia	Китай	2014
MW556295	SJZ-YL	Pyrus	Китай	2020
LC184610	N297	Citrus unshiu	Японія	1987
LN559086	WR-1	Rosa brunonii	Індія	2013
LN823987	RuEl-7	Rubus ellipticus	Індія	2015

Наступним етапом роботи для відібраних послідовностей була побудована теплова матриця ідентичності (**Рис.16**) з використанням

інструментів інтегрованих в пакет програм SDTv1.2. (Перед цим було проведено попарне вирівнювання нуклеотидних послідовностей в MEGA11 з використанням ClustalW).

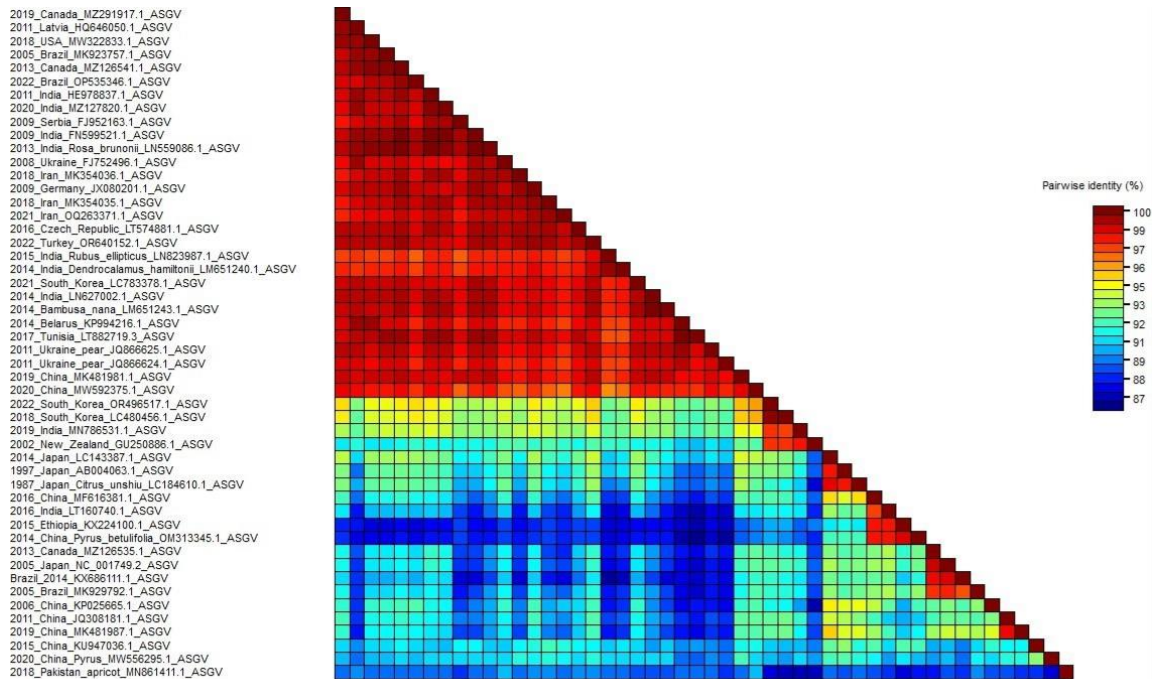


Рис.16 Теплова матриця ідентичності нуклеотидних послідовностей ізолятів ASGV.

З отриманого зображення видно, що ізоляти ASGV з різних країн поділяються на 4 групи з високою ступінню ідентичності послідовностей.

До першої та найбільшої з них належать ізоляти з Канади, Латвії, США, Бразилії, Індії, Сербії, Ірану, Німеччини, Чехії, Туреччини, Південної Кореї, Білорусі, Тунісу, Китаю, а також Українські ізоляти.

Інші групи значно менші за розміром. Друга з них представлена ізолятами з Південної Кореї, Індії та Нової Зеландії. До третьої входять ізоляти з Ефіопії, Індії та Китаю. Четверта представлена ізолятами з Бразилії та Японії.

Цікавим є той факт, що ізоляти з високою ідентичністю послідовностей зустрічаються у географічно віддалених між собою регіонах що потенційно вказує на те, що їх занесення відбулося з посадковим матеріалом, так як вектори для ASGV відсутні.

Для верифікації результатів було побудовано графік відсоткової ідентичності послідовностей за фрагментом капсидного білка ізолятів ASGV з використанням пакету програмного забезпечення SDTv1.2.

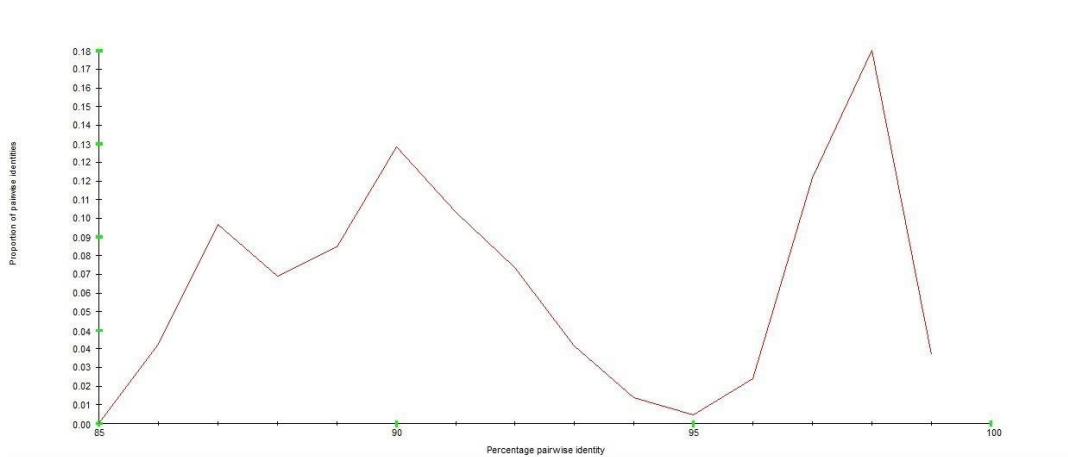


Рис.17 Графік відсоткової ідентичності послідовностей фрагменту CP нуклеотидних послідовностей ізолятів ASGV.

На графіку (Рис.17) можна побачити декілька пікових значень, які відповідають кожній з груп ізолятів. Крайній правий пік відповідає за ідентичність ізолятів всередині найбільшої групи, що лежить в межах 95-98%. Інші піки відображають менші підгрупи.

Дослідження рекомбінаційних подій для відібраних ізолятів ASGV було виконано за допомогою пакету програм RDP4. Для цього застосовувались методи RDP, GENECONV, BOOTSCAN, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN, LARD, 3SEQ, Distance Plot і TOPAL.

В результаті (Рис.18) було виявлено тільки дві події. З високою долею ймовірності це свідчить скоріше про похибку в результаті роботи

алгоритмів вирівнювання, а не про сам факт рекомбінації. Для українських ізолятів ASGV рекомбінацій або реасортацій виявлено не було.



Event no.	End in	Recomb.	Major parent	Minor parent	Detection method
1	1	2020_Ind	2022_Br	2018_So	-+-----
2	1	2005_Bra	1987_Ja	2018_So	-----+

Рис.18 Результати рекомбінаційного аналізу для ізолятів ASGV.

Для виявлення часу дивергенції українських ізолятів було проведено філогенетичний аналіз відібраних послідовностей ASGV за допомогою програм BEAST та BEAUti з використанням методу молекулярного годинника. Для візуалізації результатів використовувався пакет програм FigTree (Рис.19).

В основі дерева лежить ізолят N297 (Код доступу GenBank LC184610), який був виділений в 1987 році в Японії з *Citrus unshiu*. Вірогідно що розповсюдження вірусів до інших країн відбулося саме з Японії.

Дивергенція українських ізолятів ASGV (Код доступу GenBank FJ752496) відбулася в 2006 році, а двох інших ізолятів ASGV-44 та ASGV-46 (Коди доступу GenBank JQ866624 та JQ866625) в 2009 році.

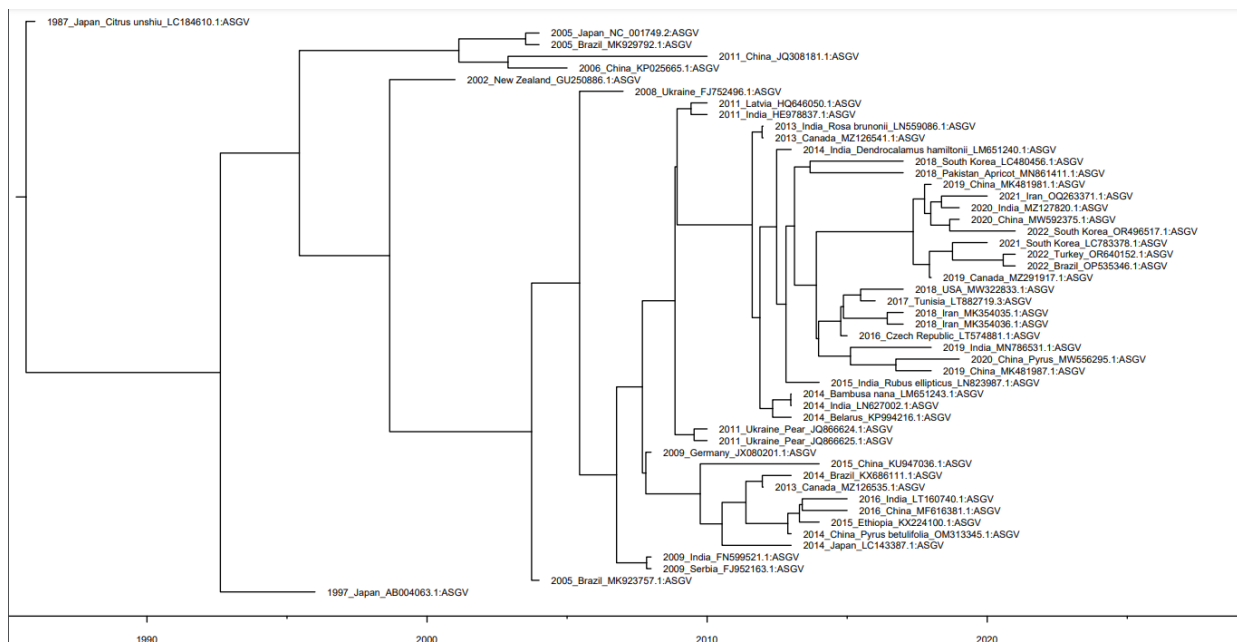


Рис.19 Філогенетичний аналіз послідовностей ізолятів ASGV з використанням молекулярного годинника.

Згідно результатів отриманих при аналізі теплової матриці ідентичності українські ізоляти не показали високого рівня гомології до ізолятів з інших країн, тому складно сказати з якої саме країни ASGV потрапив на територію України.

Враховуючи дуже широке географічне розповсюдження ASGV, відсутність векторів а також присутність ізолятів з високим рівнем філогенетичні спорідненості у віддалених між собою країнах можна припустити що занесення вірусу відбулося з ураженим посадковим матеріалом. Подальше розповсюдження вірусу відбувалось природнім шляхом, якому сприяла висока щільність посадки плодкових рослин при їх комерційному вирощуванні.

3.2 Аналіз українського ізоляту ASPV

Для початку за допомогою програми BLAST була проаналізована нуклеотидна послідовність капсидного білка українського ізоляту ASPV (код доступ GenBank FJ970952). Результати пошуку представлені на **Рис.**

Виявилось, що досліджуваний фрагмент СР українського ізоляту має найвищу степінь спорідненості до ізолятів (13TF189В, 13TF189С, 40/80, 38 та 13TF155В). Відсоток ідентичності становить (87,31-88,69%).

Країни походження зразків: Канада (3 зразки), Німеччина та Китай.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 11UASP coat protein gene, partial cds	Apple stem...	1471	1471	100%	0.0	100.00%	796	FJ970952.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 13TF155B complete genome	Apple stem...	972	972	100%	0.0	88.69%	9259	MZ148008.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 38 coat protein (cp) gene, partial cds	Apple stem...	966	966	100%	0.0	88.58%	1218	FJ819187.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 40/87 complete genome	Apple stem...	922	922	100%	0.0	87.61%	9270	MK836301.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 13TF189C complete genome	Apple stem...	911	911	100%	0.0	87.34%	9205	MZ148078.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 13TF189B complete genome	Apple stem...	911	911	100%	0.0	87.31%	9250	MZ148077.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate Fuji-BJ complete genome	Apple stem...	883	883	100%	0.0	86.72%	9265	OP535342.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 398ASP coat protein gene, partial cds	Apple stem...	883	883	100%	0.0	86.73%	796	FJ970953.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate J30ASP coat protein gene, partial cds	Apple stem...	883	883	100%	0.0	86.70%	796	FJ970949.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple stem pitting virus isolate 13TF162B complete genome	Apple stem...	872	872	100%	0.0	86.43%	9258	MZ148018.1

Рис.20 – Результат BLAST аналізу послідовності фрагменту капсидного білка українського ізоляту ASPV.

Усього за результатами пошуку в базі даних GenBank було знайдено 424 послідовності ASPV. В отриманій вибірці були присутні як послідовності капсидних білків, так і повнорозмірні геноми. Для проведення подальшого дослідження було відібрано 49 послідовностей (Табл.3). Така кількість зразків є досить репрезентативною вибіркою та дозволяє отримати достовірну топологію в результаті подальшого аналізу.

Табл.3 Основна інформація про відібрані послідовності ізолятів ASPV.

Код доступу GenBank	Ізолят	Хазяїн	Країна походження	Рік відбору зразку
FJ970952	11UASP	Malus domestica cv. Jonagold	Україна	2009
MZ148008	13TF155B	Malus domestica	Канада	2013

FJ619187	38	Malus domestica cv. Dabinnette	Китай	2008
MK836301	40/87	Malus domestica Bittenfelder	Німеччина	2019
OP535342	Fuji-BJ	Malus domestica cv. Fuji	Бразилія	2022
FJ970953	398ASP	Malus domestica	Бельгія	2009
FJ970949	J30ASP	Malus domestica	Польща	2009
FJ970956	A3ASP1	Malus domestica	Індія	2009
MK923756	BR-Mish3	Malus domestica cv. Mishima	Бразилія	2005
FJ970951	8UASP	Malus domestica	Україна	2009
AF438521	MT32	Malus domestica cv. Jonagold	Польща	2001
KY123752	Liu1	Nanking Cherry	Китай	2013
KC791788	ASPV-KJH-HR-JS3	Malus pumila	Південна корія	2012
LC475150	ASPV_SG	Pyrus pyrifolia	Південна Корея	2018
KY081187	FS05-3-3	Malus domestica	Китай	2015
AF438522	MT24	Malus domestica cv. Azwell Spur	Польща	2001
MW810248	AGK69	Malus domestica cv. Golden	Греція	2006

JX673814	HB-HN10	Pyrus	Китай	2010
FJ970960	TK3ASP	Malus domestica	Туреччина	2009
D21828	PSA-H	Pyrus	Німеччина	1993
KY429160	III_100_6	Pyrus	Польща	2013
AJ968944	CzAp36	Malus domestica cv. Rubin	Чехія	2005
MW810246	AUM109	Malus domestica	Греція	2006
JX673828	ZJ-YG1	Pyrus	Китай	2010
OR640151	ASPV_T	Malus domestica	Туреччина	2022
OM313376	ASPV-HB-Pb2-15Z	Pyrus betulifolia	Китай	2014
KM873720	ASPV_leaves	Malus domestica cv. Royal Delicious	Індія	2014
HM352767	VY1	Pyrus pyrifolia var. Hengshen (pear)	Тайвань	2006
AB045371	IF38	Malus domestica	Японія	2000
LC743847	CNU_apple MH	Malus domestica cv. Miyabi fugi	Південна Корея	2022
FJ970955	405ASP	Malus domestica	Бельгія	2009
LC533839	GCSPV2	Malus domestica P190	Японія	2013
KF321966	PB66	Malus domestica	Англія	2009
KY176810	E_17	Pyrus	Чехія	2013
LC507884	ASPV-BH	Malus sp.	Південна Корея	2019

KR149242	ASPV_Fan_S h-2	Malus x domestica	Білорусь	2014
JQ247995	ASPV-42	Pear	Україна	2010
LC653495	ASPV_SCP1	Malus domestica	Південна Корея	2021
HQ661837	LV-m205	Malus domestica	Латвія	2010
KT900171	AP1	Malus domestica	Іран	2014
MW051700	SL72.24	Loquat	Іспанія	2020
LC367340	OS	Pyrus pyrifolia	Південна Корея	2017
HQ339957	SB12452	Prunus persica variety Neptune GF305	Франція	2010
EU753979	99B.SdP2B.C P1	grapevine cv. Shiraz clone 99B plant SdP2	Південна Африка	2008
GQ265914	KRL1	Kuerle pear	Китай	2009
AF345893	GNKVII/34	Pyrus	Польща	2001
MW810256	QGK58	Quince cv. Gigas	Греція	2006
KY429187	VIII_99_2	Pyrus	Польща	2013
JX673820	HB-YH18	Pyrus	Китай	2012

Для аналізу філогенетичних зв'язків між українськими ізолятами та ізолятами з інших країн була побудована теплова матриця ідентичності. При її побудові були використані алгоритми вирівнювання послідовностей рекомендовані MEGA11. (Рис.21)

При аналізі теплової матриці ідентичності нуклеотидних послідовностей можна виділити лише чотири невеликі підгрупи з високою

ступінню гомології всередині цих груп, до яких входять ізоляти з наступних країн.

До першої групи входять ізоляти з Польщі та Південної корей, до другої з Польщі та Індії, до третьої з Китаю та Тайваню, до четвертої з Бразилії, Індії та Польщі. Степінь спорідненості українських ізолятів до ізолятів з інших країн доволі низька, та лежить в межах 74-92%.

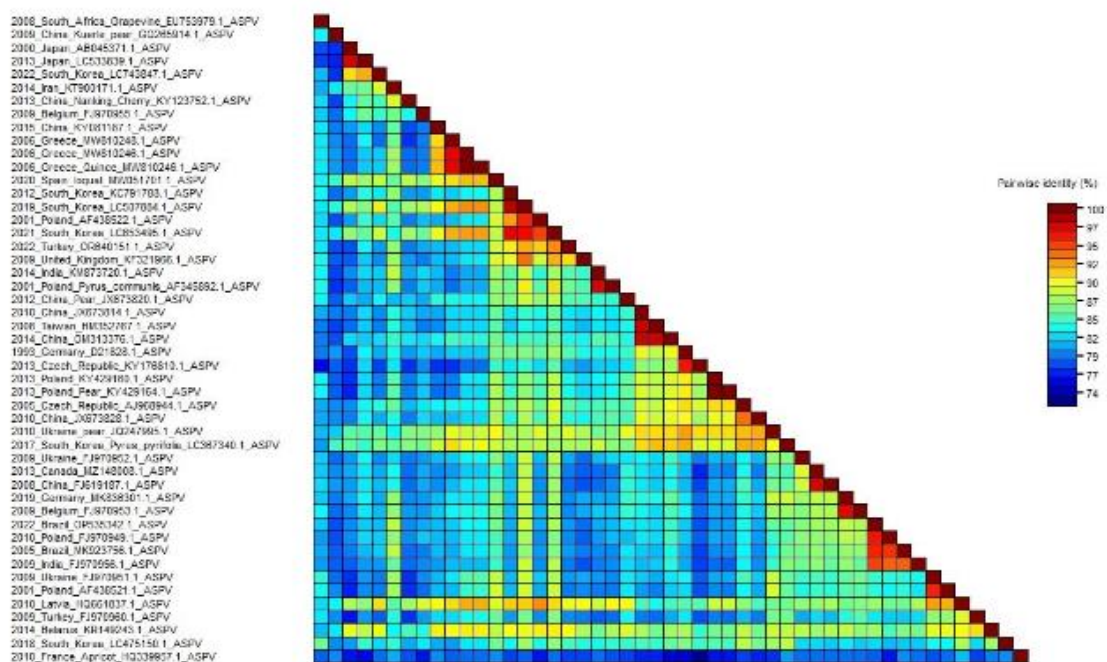


Рис.21 Теплова матриця ідентичності нуклеотидних послідовностей ізолятів ASPV.

Загальна низька ступінь спорідненості між ізолятами пояснюється тим, що одним з критеріїв демаркації виду ASPV є ідентичність між генами капсидного білку або полімерази в межах від 72 до 80% внаслідок високої ступені варіабельності цих ділянок.

Графік відсоткової ідентичності ізолятів (Рис.22) підтверджує результати, отримані при аналізі теплової матриці. Пікові значення графіка знаходяться на відмітках в 82%, 86% та 88%, та відображають більшість

послідовності, що знаходяться за межами описаних вище підгруп. Спорідненість ізолятів з описаних підгруп лежить в межах 95- 97% (на графіку можна спострігати невеликі пікові значення саме на цих позначках).

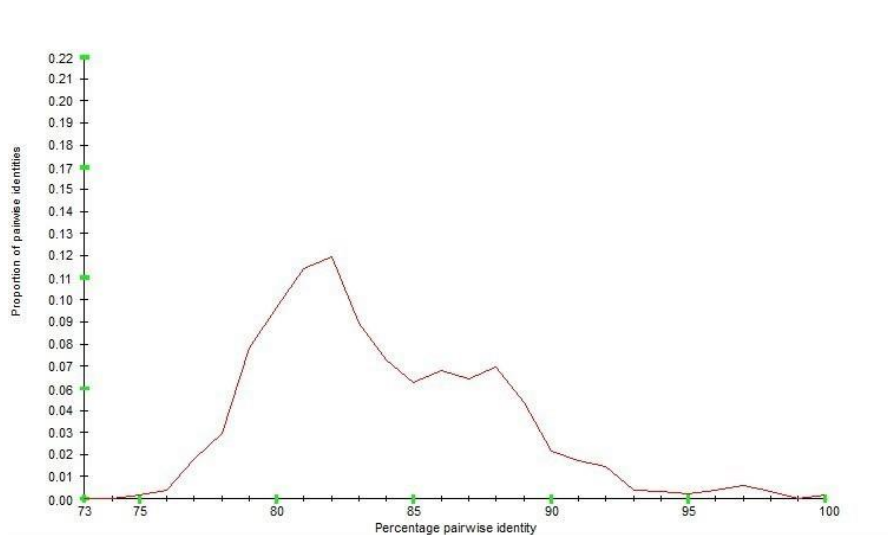


Рис.22 Графік відсоткової ідентичності фрагменту капсидного білка нуклеотидних послідовностей ізолятів ASPV.

Філогенетичне дерево отримане та візуалізоване з використанням програм BEAST та BEAUTi (**Рис.23**) будувалось для визначення часу відділення українських ізолятів ASPV та потенційних країн з яких воно відбулося.

В основі дерева лежить ізолят PSA-H виділений з зразків груші відібраних в 1993 році в Німеччині (Код доступу GenBank D21828. Яскраво вираженого розгалуження на окремі клади не спостерігається.

Український ізолят 8UASP виділений зі зразку *Malus domestica* у 2009 році (Код доступу GenBank FJ970951) демонструє високу степінь спорідненості з турецьким ізолятом TK3ASP (Код доступу GenBank

FJ970960) того ж року, що свідчить про їх занесення разом з посадковим матеріалом. Інші два ізоляти знаходяться за степінню спорідненості близько до ізолятів з Китаю.

Дивергенція ізоляту 8UASP відбулась в 2004 році, ізоляту ASPV-42 в 2007 році, ізоляту 11UASP в 2005 році.

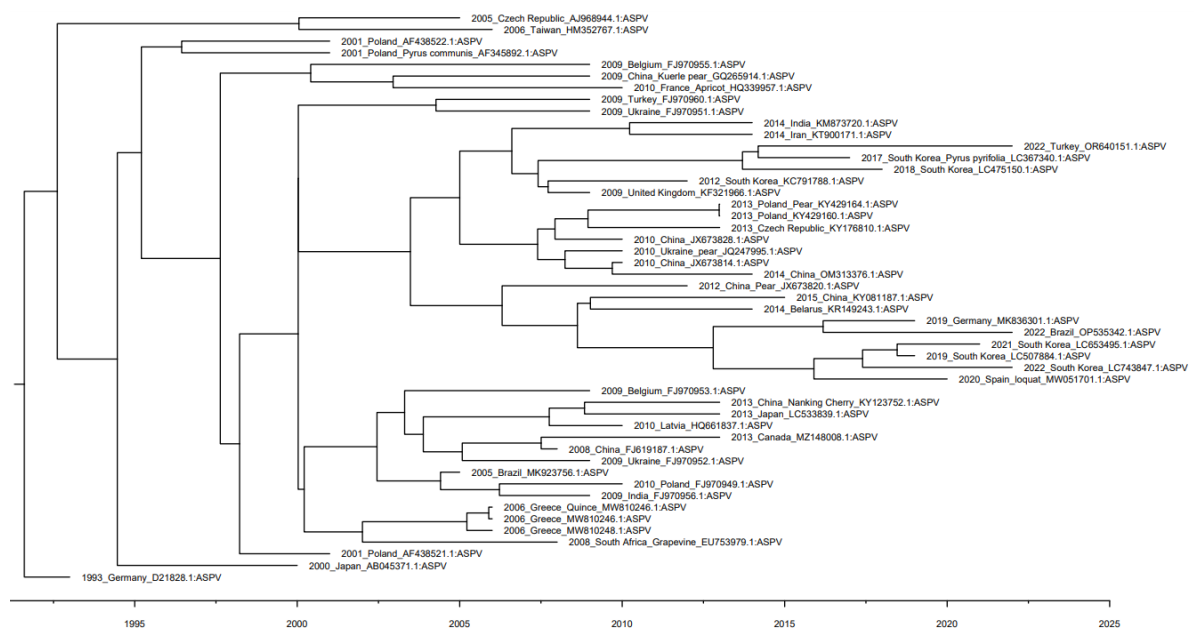


Рис.23 Філогенетичний аналіз послідовностей ізолятів ASPV з використанням методу молекулярного годинника.

Для визначення місця з якого відбулося занесення вказаних ізолятів потрібно проаналізувати з якими країнами відбувався обмін посадковим матеріалом в 2004, 2005 та 2007 роках. З побудованого дерева визначити цю інформацію неможливо.

Дослідження рекомбінацій та реасортацій для відібраних ізолятів ASPV виконувалось за допомогою пакету програм RDP4 (Рис.24).

Overview						
Evn	Fnd	Recomb.	Major	Mino	Detection	meth
no.	in		parent	parent	RGBM	CST
1	4	2012_So	2013_Cz	Unknown	+ - -	+ + + +
2	8	1993_Ge	2013_Cz	2015_Chi	+ + -	+ - - +
3	3	2009_Bel	2010_Fra	2006_Gr	- - -	+ - + -
4	4	2022_Bra	2006_Gr	2008_So	- - -	+ - - -

Рис.24 Результати рекомбінаційного аналізу для ASPV

Рекомбінації та реасортації були для деяких з ізолятів були виявлені методами: RDP, GENECONV, MAXCHI, CHIMAERA, SISCAN, LARD, 3SEQ, Distance Plot і TOPAL. Метод BOOTSCAN жодних подій не виявив. Для українських ізолятів жодних рекомбінацій та реасортацій виявлено не було.

Отримані результати можна пояснити тим, що характерним критерієм демаркації виду ASPV є висока варіабельність ділянок гену капсидного білка та полімерази, Саме в цій ділянці і відбулася більшість з виявлених подій/

3.3 Аналіз українського ізоляту ACLSV

З використанням програми BLAST була проаналізована нуклеотидна послідовність капсидного білка українського ізоляту ACLSV (код доступу GenBank ON641871) (Рис.25).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate UKR5-36 coat protein gene, complete cds	Apple chloro...	1075	1075	100%	0.0	100.00%	582	ON641871.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate LV100 coat protein gene, complete cds	Apple chloro...	887	887	97%	0.0	94.74%	582	ON641864.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate LV98 coat protein gene, complete cds	Apple chloro...	885	885	97%	0.0	94.88%	582	ON641863.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate ACLSV_14_22_LT coat protein gene, complete cds	Apple chloro...	870	870	97%	0.0	94.21%	776	KY273464.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus cp gene for coat protein, genomic RNA, almond isolate fr...	Apple chloro...	870	870	97%	0.0	94.21%	794	AM498046.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus cp gene for coat protein, genomic RNA, apricot isolate fro...	Apple chloro...	870	870	97%	0.0	94.21%	794	AM498045.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus cp gene for coat protein, genomic RNA, isolate Salooni	Apple chloro...	870	870	97%	0.0	94.21%	793	AM494513.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus cp gene for coat protein, genomic RNA, isolate Bajaura	Apple chloro...	870	870	97%	0.0	94.21%	794	AM494510.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate M075 coat protein gene, complete cds	Apple chloro...	865	865	97%	0.0	94.04%	582	KX668485.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Apple chlorotic leaf spot virus isolate YT-24-1-4 coat protein (CP) gene, complete cds	Apple chloro...	865	865	97%	0.0	94.04%	764	KF735122.1

Рис.25 – Результат BLAST аналізу послідовності фрагменту капсидного білка українського ізоляту ACLSV.

Загалом у результаті пошуку в базі даних GenBank було знайдено 729 послідовностей ACLSV з різних країн. Для проведення подальшого дослідження було відібрано 47 послідовностей, які становлять репрезентативну вибірку, так як при їх відборі виключалась частина ізолятів, що дублюються за роком відбору зразків та країною їх походження (Табл.4).

Табл.4 Основна інформація про відібрані послідовності ізолятів ACLSV.

Код доступу GenBank	Ізолят	Хазяїн	Країна походження	Рік відбору зразку
ON641871	UKR5-36	<i>Pyrus communis</i>	Україна	2011
ON641864	LV100	<i>Pyrus communis</i> 'Conference'	Латвія	2010
KY273464	ACLSV_14_22_LT	<i>Malus domestica</i> x	Литва	2014
AM498046	ACLSV	<i>Prunus dulcis</i>	Індія	2007
KX668485	M075	<i>Malus domestica</i> cv. Cripps Pink	Бразилія	2016
KF735122	YT-24-1-4	<i>Malus domestica</i>	Китай	2012

KY579382	ACLSV_16_133A_LT	Malus x domestica	Литва	2016
KX224102	ACLSV-Eth1	Malus pumila	Ефіопія	2015
OK340218	DSMZ PV-0998	Malus sylvestris	Німеччина	2021
MZ126517	13TF180B	Malus domestica	Канада	2013
OK338671	Yanfu	Malus domestica	Китай	2020
LC533838	RRACV2	Malus domestica PK51	Японія	2013
EF138602	BR 1	Malus domestica	Бразилія	2006
OP547330	Fuji-BJ	Malus domestica cv. Fuji	Бразилія	2022
OR640150	ACLSV_T	Malus domestica	Туреччина	2022
AB326224	B6	Malus domestica	Японія	2007
MK354027	Sq	Malus domestica	Іран	2018
KY273463	ACLSV_14_21_LT	Malus x domestica	Литва	2014
LC475152	ACLSV_WH	Pyrus pyrifolia	Південна Корея	2018
GU327995	PP39	Pyrus	Китай	2009
AB060963	MO31	Malus domestica	Японія	2001
AM498048	ACLSV	Chuli	Індія	2007
MH534883	TL11	Malus pumila	Китай	2017
OQ731902	DSMZ PV-1000	Malus sylvestris	Німеччина	2023

ON641873	NZ4	Malus sp.	Латвія	2021
JQ866622	ACLSV-43	Pyrus	Україна	2011
KY273474	ACLSV_15_80A_LT	Malus x domestica	Литва	2015
KC847061	MS	Malus domestica	Китай	2011
PP035105	GSR4	Psidium guajava	Індія	2023
MK086027	ACLSV-K2	Malus domestica cv. Aport	Казахстан	2014
FJ952173	8Sr	Malus domestica cv. Budimka	Сербія	2009
KM586372	T7Ja	Malus domestica	Іран	2013
AJ586641	MP-Tur	Malus domestica	Туреччина	2003
AJ586626	M93	Malus domestica	Албанія	2003
DQ834688	SKIL	Malus domestica	Ізраїль	2006
LC507889	ACLSV-CS	Malus sp.	Південна Корея	2019
GQ334190	Malus0235	Malus domestica	Канада	2008
MH521130	M075	Malus domestica cv. Cripps Pink	Бразилія	2001
FJ952171	13Uk	Malus domestica cv. Champion	Україна	2009
FJ952170	7Uk	Malus domestica	Україна	2009
AJ586643	PC-CAL	Pyrus	Італія	2003
AJ586634	Apr 62	Prunus Armeniaca	Іспанія	2003

HM352769	LTS2	Pyrus pyrifolia	Тайвань	2004
X99752	Balaton1	Malus domestica cv.	Франція	1996
KU749437	804/9	Prunus Persica cv. Turki Sorkh	Афганістан	2014
APCCOMS	P-205	Malus domestica	Японія	1993
JQ866623	ACLSV-49	Pyrus	Україна	2011

При проведенні філогенетичного аналізу для 47 відібраних послідовностей була побудована теплова матриця ідентичності (**Рис.26**) з використанням інструментів інтегрованих в пакет програм SDTv1.2. Алгоритм вирівнювання послідовностей - ClustalW.

З отриманої в результаті матриці можна побачити що більшість відібраних ізолятів, що утворюють велику групу з ідентичністю послідовностей близько 94% всередині неї. Українські ізоляти до цієї групи не входять та мають невисоку степінь спорідненості як між собою, так і з ізолятами відібраними з інших країн.

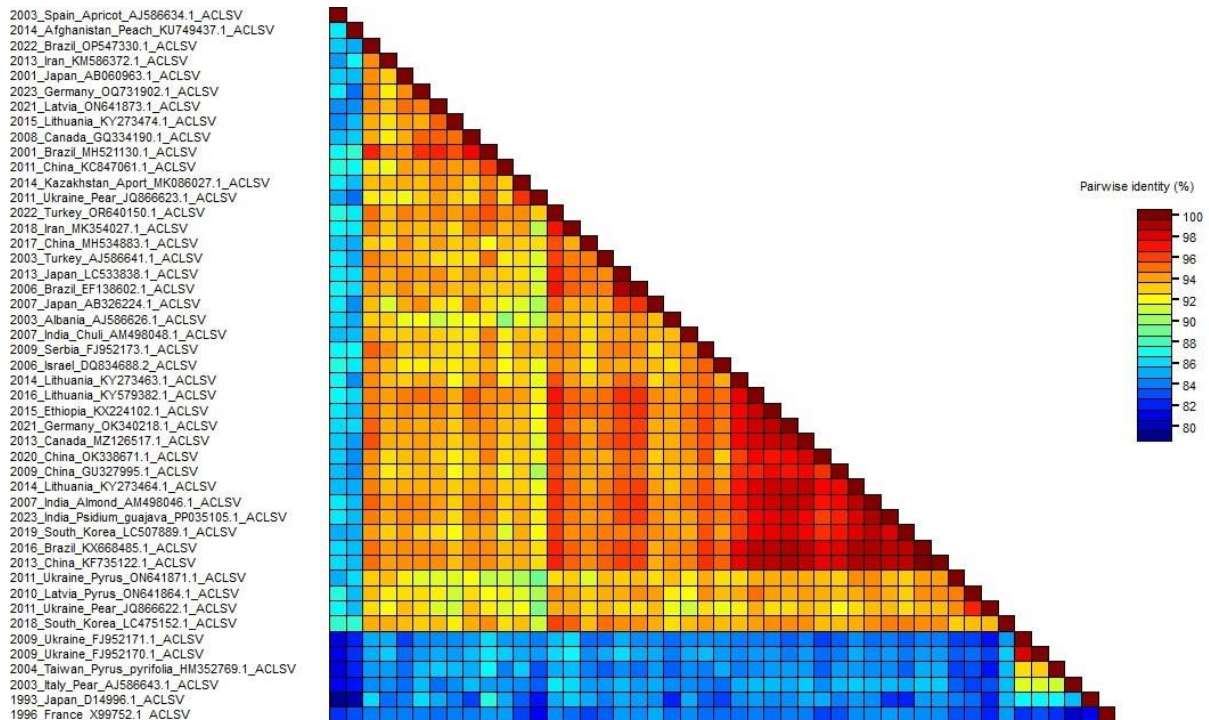


Рис. 26 Теплова матриця ідентичності нуклеотидних послідовностей ізолятів ACLSV.

Для перевірки отриманих при побудові матриці теплової ідентичності результатів за допомогою RDP4 було побудовано відповідний їй графік (Рис.27). Для побудови використовувались раніше відібрані послідовності ACLSV.

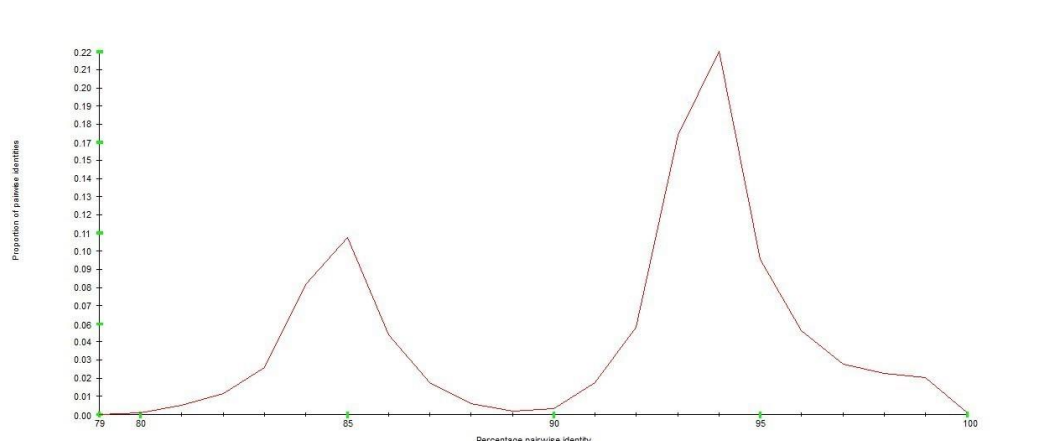


Рис. 27 Графік відсоткової ідентичності фрагменту капсидного білка нуклеотидних послідовностей ізолятів ACLSV.

При аналізі графіку можна виокремити два основні піки, які знаходяться на позначках в 85% та 94% відсотків ідентичності. Вони виражають основні дві групи ізолятів.

Українські ізоляти мають невисоку степінь спорідненості як між собою, так і з ізолятами відібраними з інших країн (до 85%) що свідчить про імовірну наявність в Україні окремого штаму ACLSV.

Дослідження рекомбінацій та реасортацій для відібраних ізолятів ACLSV виконувалось за допомогою методів інтегрованих до пакету програм RDP4. Використовувались базові налаштування. Отримані результати зображено на (Рис.28)



Overview						
Evnt	Pos	Recomb.	Major parent	Minor parent	Detection	Method
no.	in				RGB	MCST
1	1	2011_Chi2022_Bra	Unknown		+	- - - - -
2	1	2011_Chi2001_Jap	2008_Isr		+	- - - - -
3	1	2011_Chi2021_Lat	Unknown		- - -	+ - - -
4	1	2011_Chi2021_Lat	Unknown		+	- - - - -

Рис. 28 Результати рекомбінаційного аналізу для ACLSV

Результати рекомбінаційного аналізу виявили поодинокі випадки мутацій методами (RDP та MAXCH). Здебільшого це були ізоляти з Китаю 2011 року відбору. Для українських ізолятів ACLSV рекомбінаційних подій виявлено не було

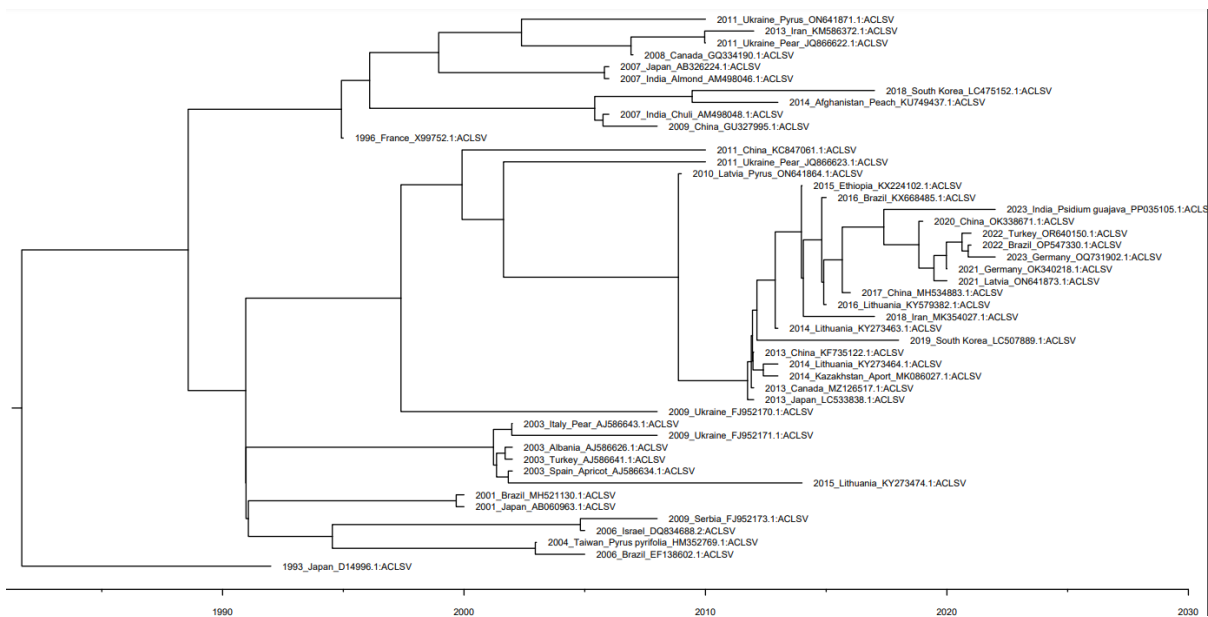


Рис.29 Філогенетичний аналіз послідовностей ізолятів ACLSV з використанням методу молекулярного годинника.

В основі дерева лежить ізолят P-205 виділений з *Malus domestica* в Японії у 1993 році (Код доступу GenBank APCCOMS). Дерево рівномірне, чітко виражений поділ на різні клади ACLSV відсутній.

Український ізолят ACLSV-43 виділений з *Pyrus* у 2011 році (Код доступу GenBank JQ866622) має найвищу спорідненість з Іранським ізолятом T7Ja (Код доступу GenBank KM586372). Дивергенція ізоляту відбулась в 2003 році.

Ізолят UKR5-36 (Код доступу GenBank ON641871) відділився від інших ізолятів в 2004 році. Спорідненості до інших ізолятів не виявлено.

Дивергенція ізоляту ACLSV-49 виділеного з *Pyrus* у 2011 році (Код доступу GenBank JQ866623) відбулась в 2003 році.

Виділений у 2009 році з *Malus domestica* ізолят 7Uk (Код доступу GenBank FJ952170) спорідненості до ізолятів з інших країн не виявив. Час його дивергенції - 2003 рік.

Виділений з яблуні сорту ‘Чемпіон’ у 2009 році ізолят 13Uk (Код доступу GenBank FJ952171) виявив спорідненість з Італійським ізолятом PC-CAL (Код доступу GenBank AJ586643). Ізолят 13Uk дивергував значно раніше, ніж інші досліджувані ізоляти (1997 рік). Ймовірніше за все саме в цей час ACLSV був занесений на територію України і в подальшому розповсюдився природнім шляхом.

Отже, в ході виконання кваліфікаційної магістерської роботи було вивчено особливості представників родини *Betaflexviridae*. Проведено філогенетичний аналіз за фрагментом капсидного білка українських ізолятів вірусу борознистості деревини яблуні, вірусу ямкуватості деревини яблуні та вірусу хлоротичної плямистості листя яблуні та проаналізовано особливості механізмів їх еволюції. Вперше було визначено час дивергенції для кожного з українських ізолятів цих вірусів.

ВИСНОВКИ

1. Українські ізоляти ASGV (ASGV, ASGV-44 та ASGV-46), формують велику групу з високою степінню спорідненості з ізолятами з 14 країн. Найвища степінь спорідненості відмічається з ізолятом ASGV_T з Туреччини та становить 98,95%. Дивергенції ізоляту ASGV відбулася в 2006 році, а двох інших ізолятів ASGV-44 та ASGV-46 в 2009 році.
2. Спорідненість українських ізолятів ASPV до ізолятів з інших країн доволі низька, та лежить в межах 74-92%. Причиною цього є висока варіабельність ділянки капсидного білка, що є одним з критеріїв демаркації виду. Дивергенція ізоляту 8UASP відбулась в 2004 році, ізоляту ASPV-42 в 2007 році, а ізоляту 11UASP в 2005 році.

3. Українські ізоляти ACLSV виявили невисоку ступінь спорідненості як між собою, так і з ізолятами відібраними з інших країн, що вказує на можливість циркуляції в Україні окремого штаму ACLSV. Дивергенція ізоляту UKR5-36 відбулась в 2004 році, ізоляту ACLSV-43 в 2003 році, ізоляту 7Uk в 2003 році, ізоляту 13Uk в 1997 році, ізоляту ACLSV-49 також в 2003 році. З усіх проаналізованих ізолятів раніше всіх відділився ізолят 13Uk (1997 рік) ймовірно за все саме в цей час ACLSV був занесений на територію України і в подальшому розповсюдився.

4. При проведенні рекомбінаційного аналізу для жодного з українських ізолятів не було виявлено реасортацій та рекомбінацій. Можна висловити припущення, що вони еволюціонують внаслідок точкових мутацій, або ж шукані рекомбінаційні події лежать поза межами досліджуваної ділянки CP.

5. Висока спорідненість українських ізолятів ASGV, ASPV з ізолятами з географічно віддалених між собою регіонів свідчить про ймовірність їх занесення на територію України разом з посадковим матеріалом, так як вектори для даних вірусів відсутні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. <https://viralzone.expasy.org/739>
2. Shokri S, Shujaei K, Gibbs AJ, Hajizadeh M. Evolution and biogeography of apple stem grooving virus. *Virology*. 2023 May 26;20(1):105. doi: 10.1186/s12985-023-02075-2. PMID: 37237285; PMCID: PMC10223889.
3. Kristensen H.R. Distribution of virus and virus-like diseases of fruit trees (surveys 1965-1985) / H.R. Kristensen // *Acta Horticulturae*. – 1985, №193. - P. 373-383.
4. Adams, M.J.; Candresse, T.; Hammond, J.; Kreuze, J.F.; Martelli, G.P.; Mamba, S.; Pearson, M.N.; Ryu, K.H.; Saldarelli, P.; Yoshikawa, N. 2011. Family Betaflexiviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (eds). *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Waltham (USA). Elsevier. ISBN 978-0-12-384684-6. pp. 920-941.

5. Goh CJ, Hahn Y. Identification of a novel member of the family Betaflexiviridae from the hallucinogenic plant *Salvia divinorum*. *Acta Virol.* 2019;63(4):373-379. doi: 10.4149/av_2019_401. PMID: 31802680.
6. Park D, Zhang M, Hahn Y. Novel Foveavirus (the family Betaflexiviridae) species identified in ginseng (*Panax ginseng*). *Acta Virol.* 2019;63(2):155-161. doi: 10.4149/av_2019_204. PMID: 31230444.
7. Bhardwaj P, Hallan V. Molecular evidence of *Apple stem grooving virus* infecting *Ficus palmata*. *Trees.* 2019;33:1–9. doi: 10.1007/s00468-018-1752-6.
8. Удовиченко В.М. Моніторинг латентних вірусів яблуні в Україні / В.М. Удовиченко // Садівництво. – 2005. - №57. – С.503-508.
9. Nickel O, Fajardo TV, Jelkmann W, Kuhn GB. Sequence analysis of the capsid protein gene of an isolate of *Apple stem grooving virus*, and its survey in Southern Brazil. *Fitopatol Bras.* 2001;26:655–9. doi: 10.1590/S0100-41582001000300014.
10. Maxim A, Zagrai L, Zagrai I, Isac M. Studies on the influence of *Apple stem grooving virus* on tree 5growth of various apple cultivars in the nursery. *Acta Hortic.* 2004; 657:41–4. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.657.2.
11. Luigi M, Donati L, Sciarroni R, Gentili A, Taglienti A, Tiberini A, Faggioli F, Ferretti L. *Carlavirus* Species Infecting Hop Plants in Italy: Molecular Identification and Phylogenetic Analyses of the Detected Isolates. *Plants (Basel).* 2023 Oct 9;12(19):3514. doi: 10.3390/plants12193514. PMID: 37836254; PMCID: PMC10574973.
12. Yoon JY, Joa JH, Choi KS, Do KS, Lim HC, Chung BN. Genetic Diversity of a Natural Population of Apple stem pitting virus Isolated

- from Apple in Korea. *Plant Pathol J.* 2014 Jun;30(2):195-9. doi: 10.5423/PPJ.NT.02.2014.0015. PMID: 25289003; PMCID: PMC4174845. 14
13. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol.* 2016; **161**:2921–49. doi: 10.1007/s00705-016-2977-6.
 14. Lister R. M., Bancroft J.B., Nadakavukaren M.J. Some sap-transmissible virus from apple / R. M. Lister // *Phytopathology.* – 1965. – V.55. – P.859-70.
 15. Inoute N., Maeda T., Mitsuata K. Citrus tatter leaf virus isolated from lily / N. Inoute, T. Maeda, K. Mitsuata // *Annals of the Phytopathological Society of Japan.* – 1979. – 45. – P. 712-720.
 16. Chung BN, Kwon SJ, Yoon JY, Cho IS. First Report of *Cnidium officinale* as a Natural Host Plant of Apple Stem Grooving Virus in South Korea. *Plant Dis.* 2022 Jan;106(1):338. doi: 10.1094/PDIS-04-21-0781-PDN. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34319765.
 17. Hu G, Dong Y, Zhang Z, Fan X, Ren F, Lu X. First report of apple rubbery wood virus 2 infection of apples in China. *Plant Dis.* 2020 Aug 25. doi: 10.1094/PDIS-04-20-0864-PDN. Epub ahead of print. PMID: 32840430.
 18. Suman R, Rani A, Rishi N, Dhir S, Hallan V, Chandel V. First report of apple stem grooving virus infection in loquat from India. *Virusdisease.* 2022 Sep;33(3):334-337. doi: 10.1007/s13337-022-00783-x. Epub 2022 Aug 8. PMID: 36277413; PMCID: PMC9481801.
 19. Magome H, Yoshikawa N, Takahashi T, Ito T, Miyakawa T. Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, japanese pear, european pear, and citrus trees. *Phytopathology.* 1997; **87**:389–96. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.4.389

20. Waterworth H. E. Dark green epinasty of *Chenopodium quinoa*, a syndrome induced by a virus latent in apple and pear / H. E. Waterworth, R. M. Gilmer // *Phytopathology*. – 1969. – 59. P.334-338.
21. Survey of Apple Chlorotic Leaf Spot Virus and Apple Stem Grooving Virus Occurrence in Korea and Frequency of Mixed Infections in Apple, Jae-Yeong Han and Jungkyu Kim and Jin Soo Cheong and Eun-Yeong Seo and Chan-Hwan Park and Hye Kyeong Ju and In Sook Cho and Takafumi Gotoh and Jae Sun Moon and John Hammond and Hyoun-Sub Lim}, *Journal of The Faculty of Agriculture Kyushu University* (2015), volume (60), pages 323-329
22. Yoshikawa N (2000) Apple stem grooving virus. *AAB Descriptions of Plant viruses* 376
23. Yoshikawa N, Sasaki E, Kato M, Takahashi T. The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology*. 1992; **191**:98–105. doi: 10.1016/0042-6822(92)90170-T.
24. Yoshikawa N, Takahashi T. Properties of RNAs and proteins of Apple stem grooving and Apple chlorotic leaf spot viruses. *J Gen Virol*. 1998; **69**:241–5. doi: 10.1099/0022-1317-69-1-241.
25. Ohira K, Namba S, Rozanov M, Kusumi T, Tsuchizaki T. Complete sequence of an infectious full-length cDNA clone of citrus tatter leaf capillovirus: comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *J Gen Virol*. 1995; **76**:2305–9. doi: 10.1099/0022-1317-76-9-2305.
26. Liebenberg A, Moury B, Sabath N, Hell R, Kappis A, Wetrzel T. Molecular evolution of the genomic RNA of *Apple stem grooving capillovirus*. *J Mol Evol*. 2012; **75**:92–101. doi: 10.1007/s00239-012-9518-z.
27. Hirata H, Lu X, Yamaji Y, Kagiwada S, Ugaki M, Namba S. A single silent substitution in the genome of *Apple stem grooving virus* causes

- symptom attenuation. *J Gen Virol.* 2003; **84**:2579–83. doi: 10.1099/vir.0.19179-0.
28. Tatineni S, Afunian MR, Gowda S, Hilf ME, Bar–Joseph M, Dawson WO. Characterization of the 5’–and 3’–terminal subgenomic RNAs produced by a capillovirus: evidence for a CP subgenomic RNA. *Virology.* 2009; **385**:521–8. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.024.
29. Pavesi A. Asymmetric evolution in viral overlapping genes is a source of selective protein adaptation. *Virology.* 2019; **532**:39–47. doi: 10.1016/j.virol.2019.03.017.
30. Yoon JY, Joa JH, Choi KS, Do KS, Lim HC, Chung BN. Genetic Diversity of a Natural Population of Apple stem pitting virus Isolated from Apple in Korea. *Plant Pathol J.* 2014 Jun;30(2):195-9. doi: 10.5423/PPJ.NT.02.2014.0015. PMID: 25289003; PMCID: PMC4174845.
31. Smith W.W. Occurrence of stem pitting and necrosis in some body stocks for apple trees / W.W. Smith // *Proc. Amer. Hort.Sci.* – 1954. – V.63. – P.101-113.
32. Rossini MN, Giayetto AL, Vera DL, Frayssinet S. First Report in Argentina of Apple stem pitting virus Causing Pear Vein Yellow Disease in Pear. *Plant Dis.* 2010 Apr;94(4):488. doi: 10.1094/PDIS-94-4-0488A. PMID: 30754511.
33. Brakta, A., Handa, A., Thakur, P.D. *et al.* *Malus pumila* ‘Spy 227’ and *Apple stem pitting virus*: graft incompatibility and epinasty. *VirusDis.* **26**, 92–96 (2015). <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0242-8>
34. Kundu J.K. Cytopathology of Apple stem pitting virus in *Nicotiana occidentalis* L. / J.K. Kundu, M. Duchacova, M. Jokes // *Biologia*, Bratislava, 61/4. – 2006. – P. 469-471.

35. Koganezawa H and Yanase H (1990) A new type of elongated virus isolated from apple trees containing the stem pitting agent. *Plant Disease* 74: 610–614.
36. Jelkmann W. Nucleotide sequences of apple stem pitting virus and of the coat protein gene of a similar virus from pear associated with vein yellows disease and their relationship with potex- and carlaviruses. *J Gen Virol.* 1994 Jul;75 (Pt 7):1535-42. doi: 10.1099/0022-1317-75-7-1535. PMID: 8021584.
37. Martelli G.P., Jelkmann W. Foveavirus, a new plant virus genus / G.P. Martelli, W. Jelkmann // *Arch. Virology.* – 1998. – 143. – P.1245-1249.
38. Yaegashi H, Takahashi T, Isogai M, Kobori T, Ohki S, Yoshikawa N. Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol.* 2007 Jan;88(Pt 1):316-324. doi: 10.1099/vir.0.82377-0. PMID: 17170464.
39. <https://gd.eppo.int/taxon/ACLSV0/photos>
40. Yoshikawa N (2001) Apple chlorotic leaf spot virus. *AAB Descriptions of Plant viruses* 386.
41. Singh RM, Singh D, Hallan V. Movement protein of Apple chlorotic leaf spot virus is genetically unstable and negatively regulated by Ribonuclease E in *E. coli*. *Sci Rep.* 2017 May 18;7(1):2133. doi: 10.1038/s41598-017-02375-y. PMID: 28522867; PMCID: PMC5437062.
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
43. <https://beast.community/>
44. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

