МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ КИЕВСЬКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО На правах рукописи АЛДАЛАИН ЭМАД ЯСИН АХМАД УДК 578.85/.86 РАЗНООБРАЗИЕ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ LYCOPERSICON ESCULENTUM В УКРАИНЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ 03.00.06 – вирусология диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Полищук Валерий Петрович КИЕВ – 2015 2 СОДЕРЖАНИЕ ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ ............................................... 5 ВСТУПЛЕНИЕ .............................................................................................. 7 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ................................................................................. 12 ГЛАВА 1 ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ ВИРУСОВ, КОТОРЫЕ ПОРАЖАЮТ РАСТЕНИЯ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE ........................ 12 1.1 Характеристика вируса табачной мозаики (Tobacco mosaic virus) ...... 12 1.2 Характеристика вируса огуречной мозаики (Cucumber mosaic virus) 15 1.3 Характеристика вируса мозаики томатов (Tomato mosaic virus) .......... 16 1.4 Характеристика вируса погремковости табака (Тobacco rattle virus).. 19 1.5 Характеристика вируса аспермии томата (Tomato aspermy cucumovirus) .................................................................................................... 21 1.6. Характеристика вируса бронзовости томата (пятнистое увядание томата) ............................................................................................................. 24 1.7.Характеристика вируса слабой крапчатости перца (Pepper mild mottle virus) ..................................................................................................... 25 ГЛАВА 2 МЕРЫ БОРЬБЫ С ВИРУСНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА SOLANACEAE ....................................................................... 27 2.1 Биологические методы борьбы .............................................................. 27 2.2 Физико-механические методы борьбы .................................................. 28 2.3 Химические методы борьбы ................................................................... 29 2.4 Агротехнические методы борьбы .......................................................... 30 ГЛАВА 3 ЭКОЛОГИЯ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ......................................... 32 3.1. Биоразнообразие вирусов растений ....................................................... 32 3.2. Вирусы растений и инвазивные виды .................................................... 34 3.3. Вирусы, растения и насекомые ............................................................... 35 3.4. Персистирующие вирусы растений ........................................................ 36 3.5. Мутуалистические вирусы растений ...................................................... 37 ГЛАВА 4 ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 40 3 4.1.Вирусы ................................................................................................... 40 4.2 Растения ..................................................................................................... 40 4.3 Материалы и реактивы, использованные в работе ............................... 40 4.4 Методы исследований ............................................................................. 41 4.4.1 Отбор образцов ...................................................................................... 41 4.4.2 Подготовка семян Lycopersicon esculentum для детекции вирусных антигенов методом ИФА ................................................................................ 42 4.4.3 Иммуноферментный анализ ................................................................. 42 4.4.4. Электронная микроскопия ................................................................... 45 4.4.5. Метод биологического тестирования ................................................. 45 4.4.6 Выделение тотальной РНК .................................................................... 46 4.4.7 Электрофорез в агарозном геле ........................................................... 47 4.4.8 Обратнотранскрипционная полимеразная цепная реакция ............... 49 4.4.9 Сиквенирование нуклеиновых кислот ................................................ 50 4.4.10 Филогенетический анализ .................................................................. 50 4.4.11 Статистическая обработка данных .................................................... 51 ГЛАВА 5 ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ LYCOPERSICON ESCULENTUM, КОТОРЫЕ ЦИРКУЛИРУЮТ В УКРАИНЕ ................................................ 52 ГЛАВА 6 ВИРУСНАЯ КОНТАМИНАЦИЯ СЕМЯН LYCOPERSICON ESCULENTUM ................................................................................................ 61 ГЛАВА 7 БИОЛОГИЧЕСКА ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ ВИРУСОВ ВЫДЕЛЕНЫХ С LYCOPERSICON ESCULENTUM ................ 66 ГЛАВА 8 ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ КАПСИДНОГО БЕЛКА УКРАИНСКИХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУ СОВ, ПОРАЖАЮЩИХ LYCOPERSICON ESCULENTUM .................................................................. 72 8.1 Филогенетический анализ генов капсидного белка вируса мягкой крапчатости перца .......................................................................................... 72 8.2 Филогенетический анализ генов капсидного белка вируса мозаики томата .............................................................................................................. 78 4 8.3 Филогенетический анализ гена капсидного белка вируса огуречной мозаики ........................................................................................................... 83 ЗАКЛЮЧЕНИЕ .............................................................................................. 96 ВЫВОДЫ ........................................................................................................ 102 СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ 104 5 ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ АГ – антиген АТ –антитело ВМТо - Вирус мозаики томата ВМКП - Вирус мягкой крапчатости перца ВПТ - Вирус погремковости табака ВОМ - Вирус огуречной мозаики ИФА – иммуноферментный анализ ДНК – дезоксорибонуклеиновая кислота РНК – рибонуклеиновая кислота кДНК – комплементарна дезоксирибонуклеїнова кислота ОТ-ПЦР – обратнотранскрипционная полимеразная цепная реакция ФСБ – фосфатно-солевой буфер ХВК – Х-вирус картофеля. ЩФ- щелочная фосфатаза BLAST – Basic Local Alignment Search Tool CP – coat protein CMV – Сucumber mosaic virus EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt MEGA – molecular evolutionary genetics analysis MP – movement protein Mr – molecular weight NCBI – National Center for Biotechnology Information 3’- NTR – 3’- nontranslation region ORF – open reading frame PMMоV – Pepper mild mottle virus SDS – dodecylsulfate Na-salt ТВЕ – tris-borat buffer TMV - Тobacco mosaic virus 6 TRV – Тobacco rattle virus ToMV – Tomato mosaic virus 7 ВСТУПЛЕНИЕ Актуальность работы. Существующие в настоящее время данные по биоразнообразию и биологическим свойствам фитовирусов базируются в абсолютном большинстве на изучении и анализе вирусов культурных растений [1]. В Украине, как и во многих странах мира, важное место среди овощных культур занимают томаты (Lycopersicon esculentum). Как известно из современных литературных источников, представители вида Lycopersicon esculentum могут поражаться более 50 вирусами - представителями разных семейств и родов, имеющих различные биологические характеристики, например пути передачи, хозяев, устойчивость к условиям внешней среды. С другой стороны, в настоящее время известно примерно 25000 сортов Lycopersicon esculentum, адаптированных к различным регионам и условиям выращивания, которые могут значительно отличаться между собой по устойчивости к различным вирусным инфекциям [2]. В разных экологических нишах (и в разных странах) в зависимости от особенностей того или иного сорта растения и вида (штамма) вируса могут реализовываться различные сценарии отношений хозяин-паразит [3]. Современное состояние обмена товарными продуктами и семенным материалом демонстрирует возможности распространения новых штаммов (или даже видов) возбудителей вирусных заболеваний растений в новых экологических нишах, что свидетельствует о необходимости постоянного мониторинга и контроля видового и штамового многообразие вирусов, которые способны поражать Lycopersicon esculentum. Для Восточной Европы наиболее вредоносными для томатов считаются 7 вирусов - ToMV (Tomato mosaic virus), TMV (Tobacco mosaic virus), TSWV (Tomato spotted wilt virus), CMV (Cucumber mosaic virus), ToAV (Tomato aspermy cucumovirus), TRV (Тobacco rattle virus) и PMMоV (Pepper mild mottle virus)[4]. В Украине время от времени проводятся исследования отдельных вирусов, которые приводят к значительному снижению урожая [5, 6] или вызывают ранее описаные 8 симптомы на Lycopersicon esculentum [7], однако системных исследований разнообразия и распространенности вирусных болезней томатов до сих пор проведено не было. Тем более нет информации о молекулярно-генетических характеристиках украинских изолятов и результатов их филогенетического анализа. Такие данные несомненно имеют как важное теоретическое значение (становится возможным проследить эволюционные траектории тех или иных вирусов, их родство и возможные направления дальнейшей эволюции), так и значительный практический интерес - на основе этих данных становится возможным создавать собственные современные диагностические тест-системы и применять их для создания устойчивых сортов. Cвязь работы с научными программами, планами, темами. Исследование выполнено в рамках комплексной научноисследовательской работы по теме: «Збереження біорізноманіття та комплексне дослідження стратегій адаптації фіто-, зоо- та віробіоти України з використанням біоінформаційних технологій» (номер госрегистрации: 0111U004649). Цель работы - Определение разнообразия вирусных болезней Lycopersicon esculentum в Украине и молекулярно-биологическая характеристика их возбудителей. Задания: 1. Проанализировать вирусные болезни Lycopersicon esculentum в Украине. 2. Идентифицировать и выделить вирусы с инфицированных растений Lycopersicon esculentum. 3. Провести биологическую характеристику вирусов выделенных с Lycopersicon esculentum в Украине. 9 4. Проанализировать семена Lycopersicon esculentum на наличие вирусных антигенов. 5. Амплифицировать и сиквенировать участки геномов ВМКП, ВОМ и ВМТо выделенных на территории Украины. 6. Провести филогенетический анализ полученных участков геномов. Объекты исследований: Вирусы, которые инфицируют томат: Вирус мозаики томата (ВМТо, ToMV (Tomato mosaic virus)); Вирус мягкой крапчатости перца (ВМКП, PMMоV (Pepper mild mottle virus)); Вирус погремковости табака (ВАТ, TRV (Тobacco rattle virus)); Вирус огуречной мозаики( ВОМ, CMV (Cucumber mosaic virus)); Предмет исследований – молекулярно-биологическая характеристика вирусов, которые инфицируют томат на территории Украины. Использование результатов работы. Результаты сиквенсов ВМТо и ВОМ зарегистрированы в международном генетическом банке данных GenBank, что позволяет использовать их в лабораториях разных стран для сравнения с нуклеотидными последовательностями других штаммов данных вирусов. Кроме того, они могут использоваться в учебном процессе при изучении спецкурса «Эволюция вирусов» для построения филогенетических деревьев. Научная новизна полученных результатов. Научное значение работы состоит в том, что автор, используя современные вирусологические и молекулярно-биологические методы, показал распространение в различных регионах Украины наиболее опасных вирусов, которые поражают овощные культуры – томаты. Филогенетический анализ кДНК гена капсидного белка 10 PMMoV показал принадлежность украинских изолятов PMMоV к кластерам штаммов вирусов Испании и Японии. Детектированные вирусные частицы пaлочкoпoдобной фoрмы, размером 300 ± 3 х 19 ± 3 нм, хaрaктeрные для вируса мoзaики тoмaта. В результате проведенного филогенетического анализа и сравнения ВМТо-ukr3 со штаммами ВМТо было установлено, что выделенный патоген является родственным со штаммами ВМТо-1-2, ВМТоG26 и ВМТо-G6. Практическое значение работы. Украинские изоляты ВМТо, ВМКП и ВОМ пополнили коллекцию вирусов кафедры вирусологии ННЦ «Институт биологии» Киевского национального университета имени Тараса Шевченко и используются для дальнейшего сравнения их свойств со свойствами нововыделенных изолятов вирусов и привлеченные в качестве тест-объектов для изучения вирусов растений в учебном процессе. Полученные результаты могут быть использованы для совершенствования методик диагностики вирусов овощных культур в Украине. Личный вклад соискателя. Диссертация является самостоятельной работой автора. Постановка задач, обработка литературных научных источников, разработка экспериментальных схем и получения экспериментальных данных, анализ и обобщение результатов, их статистическая обработка, формулирование выводов диссертации сделаны автором лично и под руководством научного руководителя д.б.н., проф .. В. П. Полищука. Исследование биологических свойств и иммуноферментный анализ осуществлен с участием к.б.н. доцента Т.П. Шевченко, филогенетический анализ - д.б.н. проф . И. Будзанивская. Апробация результатов диссертации. Основные результаты исследований и положения диссертации докладывались и обсуждались на: VII Международной конференции «Биоресурсы и вирусы» (Киев, 2013); XIII в Съезде общества микробиологов Украины им. С.М. Виноградского (Ялта, 2013); Х Международной научной конференции студентов и аспирантов "Молодежь и прогресс биологии", 8-11 апреля 2014 года, Львов и 11 Международной научной конференции студентов и аспирантов "Молодежь и прогресс биологии", 20-24 апреля 2015, Львов. Публикации. Результаты исследований представлены в 9 печатных работах, из них 5 статей в профильных отечественных и международных изданиях и 4 тезисов в материалах конгрессов, съездов и конференций. Права соавторов не нарушены. Структура и объем диссертации Диссертация состоит из введения, 8 глав, заключения, заключения, списка использованной литературы, охватывает 203 наименования, в том числе 89 латиницей. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, из них основной текст работы изложен на 112 страницах. Фактический материал диссертации представлены в виде 19 рисунков и 5 таблиц.

ВЫВОДЫ В работе были проанализированы вирусные болезни Lycopersicon esculentum в Украине, были идентифицированы и выделены вирусы из инфицированных растений. Осуществлен анализ семян Lycopersicon esculentum на наличие вирусных антигенов. Проведен филогенетический анализ участков геномов РММоV, CМV и ТоМV, выделенных на территории Украины. Полученные результаты представлены в следующих выводах: 1. По характерным симптомам, с использованием биологического тестирования, электронной микроскопии и иммуноферментного анализа доказано наличие 4х из семи актуальных для Европы вирусов, которые поражают Lycopersicon esculentum, а именно представителей вирусов рода Tobamovirus (РММоV, ТоМV), рода Cucumovirus (CМV) и рода Tobravirus (TRV) в исследуемых областях Украины. 2. Украинские изоляты РММоV, CМV, TRV и ТоМV, выделенные из Lycopersicon esculentum в Украине, по своим биологическим свойствам тождественны их типичным представителям. 3. Анализ семенного материала Lycopersicon esculentum с помощью ИФА и ПЦР показал наличие ТоМV (вируса мозаики томатов) в 40% и CМV (вируса огуречной мозаики) в 15% проанализированных образцов, что свидетельствует о необходимости тщательного контроля семенного материала. 4. Из семян украинских производителей L. еsculentum получено кДНК гена капсидного белка вируса мозаики томата ТоМV-ukr3 размером 480 п.о. В результате проведенного филогенетического анализа и сравнения ТоМV-ukr3 с охарактеризованными штаммами ТоМV было установлено, что выделенный патоген является родственным со штаммами ТоМV-1-2, ТоМVG26 и ТоМV-G6. Показано, что обнаруженный изолят не относится к високопаногенным штаммам, которые могут преодолевать устойчивость сортов к данному вирусу. 103 5. Впервые в Украине из растений Lycopersicon esculentum был выделен изолят вируса мягкой крапчатости перца (РММоV), получено и депонировано в GeneBank нуклеотидную последовательность кДНК гена капсидного белка украинского изолята РММоV размером 387 bp. 6. Филогенетический анализ кДНК гена капсидного белка PMMoV показал принадлежность украинского изолята PMMоV к кластеру штаммов вирусов Испании и Японии, что может свидетельствовать о недавнем переходе украинского изолята с перца на томат. 7. Украинские изоляты CМV, выделенные из растений Lycopersicon esculentum, представлены только в кластере группы І (в подгруппе ІВ). Наиболее родственными к украинским изолятам оказались штамм АВІ из Кореи и штамм SD из Китая, что может свидетельствовать о патогенном потенциале украинских изолятов CМV.