

12. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // *J. Virol. Meth.* – 1997. – Vol. 68. – P. 127–137.
13. James D., Varga A. Preliminary molecular characterization of *Plum pox virus* isolate W3174: evidence of a new strain // *Acta Hort.* – 2004. – Vol. 657. – P. 177–182.
14. Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczyk L., Candresse T. Sequence Variability, Recombination Analysis and Specific Detection of the W Strain of Plum pox virus // *Phytopathology.* – 2011. – Vol. 101. – P. 980–985.
15. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731–2739.
16. Glasa M., Prichodko Y., Zhivaeva T., Schneider Y., Predajna L., Subr Z., Candresse T. Complete and partial genome sequences of the unusual *Plum pox virus* (PPV) isolates from sour cherry in Russia suggest their classification to a new PPV strain. Book of Abstracts of 22th International Conference on Virus and Other Transmissible Disease of Fruit Crops. June 3–8, 2012. Rome, Italy. – 2012. – P. 37.
17. Чирков С.Н., Бызова Н.А., Шевелева А.А., Митрофанова И.В., Приходько Ю.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Испытания отечественных иммуно хроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // *Сельскохозяйств. Биол.* – 2012. – №1. – С. 110–116.
18. Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S. Occurrence and genetic diversity of Winona-like Plum pox virus isolates in Russia // *Plant Dis.* – 2012. – Vol. 96. – P. 1135–1142.
19. Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е.Е. Изучение штаммов вируса шарки слив в Российской Федерации // *Защита и карантин растений.* – 2011. – №11. – С. 29–32.

CHIRKOV S.N., IVANOV P.A., SHEVELEVA A.A.

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University
Russia, 119991, Moscow, Leninskie Gory 1/12, e-mail: s-chirkov1@yandex.ru*

DISCOVERY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A NOVEL PLUM POX VIRUS STRAIN

Aim. Atypical isolates of Plum pox virus (PPV) discovered in naturally infected sour cherry in urban ornamental plantings in Moscow, Russia have been studied. **Methods.** The isolates were detected by polyclonal double antibody sandwich ELISA and RT-PCR using universal primers specific to 3'-non-coding and to coat protein (CP) genome regions but failed to be recognized by triple antibody sandwich ELISA with the universal monoclonal antibody 5B and by RT-PCR using primers specific to the conventional PPV strains. **Results.** The CP gene sequence analysis of 9 isolates revealed the 99.2 – 100% of within-group identity and 62 - 85% identity with the conventional PPV strains. **Conclusion.** Phylogenetic analysis and alignment of the N-terminal CP aa sequences showed that the atypical isolates represent a group distinct from the known PPV strains and belong to a new tentative PPV strain CR.

Key words: *Plum pox virus*, sour cherry, phylogenetic analysis, PPV strain CR.

ШПИЛЬЧИН В.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

*Національний університет «Києво-Могилянська Академія» МОН України
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net*

ЗАСТОСУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЙ IRAP ТА РАМАР ДЛЯ ПОШУКУ ПОЛІМОРФІЗМУ СЕРЕД АМФІДИПЛОЇДІВ, НЕСТАБІЛЬНИХ ЗА ОЗНАКОЮ ВОСКОВА ОСУГА

Штучний гексаплоїд Авротика має геном ААВВТТ, де частина ААВВ від м'якої пшениці, ТТ — геном диплоїдного егілопса *Aegilops mutica*. Амфідиплоїд Міоза (ААВВМ^tМ^t) об'єднує геноми твердої пшениці *Mutiko italicum* (ААВВ) та диплоїда *Ae. comosa* (М^tМ^t). Ініціальні амфідиплоїди не мали воскової осуги на листках та колосі, тобто були зеленими. За

кілька генерацій серед зелених рослин стали з'являтися рослини з восковою осугою, блакитні, які не відрізнялись від зеленої форми за жодною з інших ознак морфології рослини [1]. Блакитні форми амфідиплоїдів є константними, зелені у кожній генерації вищеплюють блакитні рослини. Можливість перезапилення та розщеплення гетерозигот повністю відкидається. Ре-

зультати попереднього гібридологічного аналізу показали, що успадкування ознаки, що досліджується, відбувається з відхиленням від співвідношень, очікуваних від розкриття біному $(3 : 1)^n$, на користь рослин з восковою осугою [2]. Останнім часом в літературі надається все більше уваги процесам, які відбуваються в природних та штучно створених амфідиплоїдах під час формування їхнього геному [4, 5]. Схоже, що у геномах Авротики та Міози, які мають гібридне походження, відбувається якийсь процес, наслідком чого є зміна домінантного алелю одного з кількох ідентифікованих на сьогодні генів, які спричиняють відсутність осуги на рослинах, на рецесивний з частотою, яка набагато перевищує відомі нам середні частоти спонтанного виникнення мутації на ген на покоління. Цей процес може відбуватися у межах так званого «геномного стресу». Одним із факторів такого процесу є активність мобільних генетичних елементів. Показано, що ретротранспозони присутні у більшості рослинних геномах і займають до 80% його розміру [5]. Дослідити їхню роль можливо за допомогою технології, що у якості

Матеріали і методи

Геномну ДНК геномно-заміщених амфідиплоїдів Авротики 1, Авротики 2, геномно-доданих амфідиплоїдів Міоза, які є контрастні за восковою осугою, а також сорту Аврора, ампліфікували з праймерами до довгих термінальних повторів ретротранспозонів.

Виділення ДНК з листя та етиольованих паростків досліджуваних рослин поводити за модифікованою методикою із СТАВ-буфером. Реакційна ПЛР-суміш об'ємом 25 мкл містила 250 нМ кожного праймера, 50 нг ДНК, по 0,2 мМ кожного дезоксинуклеотидтрифосфату, 1,5 мМ $MgCl_2$, 1 у Taq-полімерази (Fermentas, Лит-

Результати та обговорення

Гексаплоїди Авротики та Міоза є самозапилювачами, тому мають характеризуватися гомозиготністю за всіма генетичними системами, що цікаві для вивчення. Блакитні варіанти Авротики та Міози є стабільними, реверсії до зелених аналогів не спостерігали жодного разу, тому цілком можливим є припущення про наявність різниці між різними зразками на генетичному рівні, в тому числі на рівні внутрішньохромосомних змін, які спричиняються рухом ретротранспозонів. Щоб перевірити таке припущення, ми скринували геноми амфідиплоїдів з різним виразом ознаки, використовуючи системи IRAP та REMAP. Гіпотеза була така: якщо варіювання

праймерів для ампліфікації застосовує фрагменти з довгих термінальних повторів ретроелементів. Для нашої роботи ми обрали дві системи: IRAP та REMAP [6]. Метод IRAP (Inter-Retrotransposon Amplification Polymorphism) виявляє поліморфізм, спричинений вставкою мобільного елемента, завдяки ампліфікації фрагменту ДНК між двома сусідніми ретротранспозонами. У даному випадку використовується один або два праймери до одного або двох типів довгих термінальних повторів ретроелемента. Метод REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplification Polymorphism) є подібним до IRAP, з тією різницею, що у ролі одного з праймерів використовується, такий, що є специфічним до певного SSR локусу. Зазначені методи дають можливість виявляти значні зміни у структурі геному штучно створених амфідиплоїдів, мінливих за ознакою інтересу. У статті викладено результати дослідження поліморфізму за ретротранспозонними системами між гексаплоїдами Авротики та Міози з восковою осугою та без неї.

ва) у буфері виробника. Умови проходження ампліфікації (35 циклів, ампліфікатор Applied Biosystem 2700): початкова денатурація – 94°C, 4 хв; денатурація – 94°C, 45 сек; гібридизація – 55°C – 61°C (в залежності від праймера), 59 сек; елонгація – 72°C, 45 сек; кінцева елонгація – 72°C, 10 хв. Продукти ампліфікації у суміші 8 – 10 мкл ампліфікату з 1 мкл буфером нанесення (30% гліцерину, бромфеноловий синій, ксиленціанол) розділяли у 1,5%-ому агарозному гелі. Продукти візуалізували за допомогою етидіум броміду.

ознаки є наслідком перебудов у хромосомі, які змінюють відстань між ретротранспозонами (або ретротранспозоном та мікросателітом), розташованими біля гена, зміна експресії якого призводить до зміни у прояві ознаки, у електрофоретичному спектрі компонентів буде реєструватися різниця між контрастними фенотипами, і ця пара ретротранспозонів (або ретротранспозон-мікросателіт) може використовуватися для подальшого дослідження геному у зв'язку з варіюванням ознаки. Отже, якщо ампліфікація відбувається і її продукти відрізняються в межах контрастних за ознакою інтересу зразків, це означає, що поряд з геном може знаходитися

послідовність – наслідок активності мобільних генетичних елементів і впливати на прояв ознаки.

Для скринування геномної ДНК штучних амфідиплоїдів, контрастних за ознакою воскова осуґа було використано багато варіантів сполучення праймерів чотирьох ретротранспозонів з

Таблиця 1. Варіанти комбінування праймерів у системах IRAP (1–5) і REMAP (6–8) та продукти ампліфікації

Комбінація праймера	T _(a)	Максимальна кількість розділених продуктів	Розмір продуктів
1. Nikita/Nikita	60	9	340-2840
2. REMAPGAn/ REMAPGAn	58	4	380-1500
3. Sukkula/Sukkula	55	20	600-4500
4. Sabrina/Sabrina	60	5	1200-2480
5. Nikita/Sukkula	60	6	360-1700
6. Nikita/(CT) ₉ G	60	9	300-1160
7. Sukkula/(CT) ₉ G	53	9	260-800
8. Sabrina/(CT) ₉ G	61	12	780-2480

З IRAP-праймерами пари Nikita/Nikita були отримані поліморфні продукти ампліфікації для контрастних зразків Авротика 1, зелена та Авротика 2, блакитна. Спектр Аврори відрізнявся від обох зразків (табл. 2). Найбільшу кількість компонентів у спектрі має амфідиплоїд Авротика 1, зелена, яка має унікальний компонент 2 (близько 1300 п.о), який і відрізняє цей спектр від спектру Аврори. Авротика 2, блакитна, має найменшу кількість компонентів і відрізняється від зеленого аналога відсутністю компонентів 2, 8, 9 та наявністю нового компоненту, 10 (850 п.о.), який не представлений ані у Аврори ані у Авротика 1. Спектри геномно-доданих форм Міоза є ідентичними (рис. 1).

Ампліфікація з праймерами до пари Sukkula/Sukkula продукувала спектри компонентів, які значно розрізняються для ДНК Аврори та геномно-заміщених амфідиплоїдів. У спектрі Авротика 2, блакитної відсутні десять компонентів, які є характерними для Авротика 1, зелена та Аврори. Авротика 1, в свою чергу, відрізняється від Аврори наявністю компонентів 1, 2, 3 та відсутністю компонента 17. Спектр компонентів ДНК Міози зелена відрізняється від такого Міози блакитної відсутністю компонентів 14, 15, 16 та наявністю компонента 10. При застосування праймерів до LTR ретротранспозонів Sabrina/Sabrina спектри компонентів контрастних форм Міози є однаковими. З даними праймерами найбільшу кількість компонентів продукує геном Аврора. Спектр Авротика 1, зеленої,

праймерами до різних мікросателітних локусів, проте продукти було отримано лише для трьох з них та одного мікросателіта (CT)₉G, широко розповсюдженого у геномі. Зате продукти ампліфікації було отримано для всіх однойменних пар з чотирьох транспозонів та для однієї пари різних транспозонів (табл. 1).

відрізняється від спектра Аврори наявністю компонента 3, та відсутністю компонента 5.

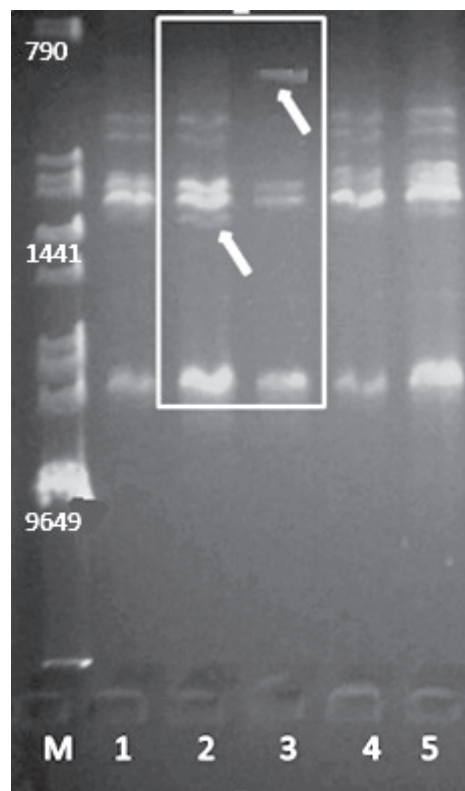


Рис. 1. Електрофоретичні спектри продуктів ампліфікації з IRAP-праймерами Nikita/Nikita. М – маркер мас, 1 – Аврора, 2 – Авротика 1, зелена, 3 – Авротика 2, блакитна, 4 – Міоза зелена, 5 – Міоза блакитна

ДНК Авротики 2, блакитної, взагалі не давала продуктів з даною парою праймерів.

Спектри компонентів, отримані з парою праймерів REMAP Sabrina/(CT)9G для контрастних зразків Міози не відрізнялися, хоча і продукували по 11 компонентів. Спектри Авротики зеленої та блакитної також один від одного не

відрізняються, хоча дуже відрізняються від спектру компонентів ДНК Аврори скороченням кількості компонентів: у Аврори 11, у обох Авротик по чотири. Апліфікація з праймерами пари REMAPGAn/ REMAPGAn продукували лише чотири компоненти, за якими поліморфізму між вивченими зразками встановлено не було.

Таблиця 2. Продукти ампліфікації геномної ДНК рослинних зразків з IRAP та REMAP праймерами

Рослинний матеріал	Продукти ампліфікації, наявні у спектрі зразка			
	Nikita/Nikita	Sukkula/Sukkula	Sabrina/Sabrina	Sabrina/(CT)9G
Аврора	1,3,4,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16,17,18	1,2,4,5	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12
Авротики 1, зелена	1,2,3,4,8,9	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,16,18	1,2,3	2,8,9,10
Авротики 2, блакитна	1,3,4,10	1,2,4,7,8,11,12	продуктів не було	2,8,9,10
Міоза зелена	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,17,18,19,20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12
Міоза блакитна	1,5,6,7,8,9	2,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20	1,3,5	2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12

Висновки

Ампліфікація ДНК геномно-заміщених та геномно-доданих амфідиплоїдів пшениці, контрастних за ознакою наявності/відсутності воскової осуги, з праймерами систем IREP та REMAP продукувала спектри компонентів, які були своєю поліморфними для різних зразків та пар праймерів. На даному рослинному матеріалі та єдина пара праймерів системи REMAP, яка дала продукти ампліфікації, Sabrina/(CT)9G, виявилася неефективною для розрізнення ДНК зразків амфідиплоїдів з контрастними генотипами. Неєфективними були пари праймерів Nikita/Nikita,

Sabrinai/Sabrina для контрастних зразків Міози та пара REMAPGAn/ REMAPGAn для всіх вивчених зразків. Поліморфізм за компонентами спектру було виявлено для пар Nikita/Nikita, Sukkula/Sukkula, Sabrinai/Sabrina при ампліфікації ДНК контрастних рослин Авротики. У всіх випадках спектр Авротики 1, зеленої, відрізнялася від спектру Аврори новим компонентом, а спектр Авротики 2, блакитної, відрізнявся від спектру зеленого аналога втратою компонентів спектру.

Література

1. Шпильчин В.В. Фенотипний поліморфізм за ознакою воскової осуги серед представників підтриби *Triticinae* / Шпильчин В.В. Антонюк М.З., Терновська Т.К // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія. – 2010. – Т. 106. – С. 3–8.
2. Шпильчин В.В., Терновська Т.К. Зміна прояву ознаки воскової осуги у генераціях амфідиплоїдів підтриби *Triticinae* // Наукові записки НаУКМА. – 2011. – Т. 119. – С. 3–7.
3. Zhao N., Xu L., Zhu B., Li M., Zhang H., Qi B., Xu Ch., Han F., Liu B. Chromosomal and genome-wide molecular changes associated with initial stages of allohexaploidization in wheat can be transit and incidental // *Genome*. – 2011. – Vol. 54, №8. – P. 692–699.
4. Liu B., Xu Ch., Zhao N., Qi B., Kimatu J.N. Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement // *J. Genet. Genomics*. – 2009. – Vol. 36. – P. 519–528.
5. Flavell R.B., Rimpau J., Smith D.B. Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes // *Chromosoma*. – 1977. – Vol. 63. – P. 205–222.
6. Kalendar R., Schulman A.H. IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting // *Nature Protocols*. – 2006. – Vol. 1. – P. 2478–2484.

SHPYLCHYN V.V., TERNOVSKA T.K.

National University of "Kyiv-Mohyla Academy"

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: vshpylchyn@bigmir.net

IRAP AND REMAP TECHNIQUES FOR POLYMORPHISM DETECTION IN AMPHIDIPOIDS WHICH ARE INSTABLE FOR GLAUCOUSNESS

Aims. To study polymorphism of amplification products derived from the DNA of amphidiploids which are contrast for glaucousness with primers of IRAP and REMAP systems. **Methods.** PCR with primers to LTR of retrotransposons and microsatellites. Electrophoresis of DNA fragments. **Results.** DNA amplification of investigated plants produced monomorphic or polymorphic components of spectrum depending on amphidiploid genome, AABBTT or AABBM^tM^t and primers used. LTR/LTR primers in this plant material were detected as more informative as LTR/SSR primers. **Conclusions.** In this plant material the polymorphism for amplification products with primers to LTR of retrotransposons for pair Nikita/Nikita, Sukkula/Sukkula, Sabrinai/Sabrina were detected.

Key words: *Triticinae*, retrotransposons, glaucousness, amphidiploids.