

ИДЕНТИФИКАЦИЯ CHV ВИРУСА В ШТАММАХ *CRYPHONECTRIA PARASITICA* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ*

Аннотация: Из коры каштана (*Castanea sativa* Mill.) выделен в чистую культуру 21 штамм фитопатогенного гриба *Cryphonectria parasitica* (Murril 1906) Barr 1978. С использованием ПЦР, удалось идентифицировать 9 штаммов обладающих признаками пониженной вирулентности – гиповирулентности, – связанной с присутствием в них РНК вируса CHV. Полученные данные расширяют возможности метода экспресс диагностики крифонеброза каштана.

Ключевые слова: CHV, *Cryphonectria parasitica*, *Castanea sativa*, ПЦР

История исследования проблемы крифонеброза или рака каштана посевного, вызываемого грибом *Cryphonectria parasitica*, насчитывает уже более ста лет и изложена в обзорах [Пасечник В.В и др. 2006, Придня М.В. 2005].

Одним из главных результатов многолетних исследований крифонеброза каштана явилось обнаружение гиповирулентных штаммов крифонебрии. Эти штаммы отличались замедленным ростом, низким уровнем пигментации и практически не образовывали пикниды. Но главной их особенностью было то, что пораженные ими деревья не погибали и были способны давать жизнеспособные семена [MacDonald and Double 2006].

Как было выявлено впоследствии, причиной гиповирулентности является ряд вирусов, называемых CHV (*Cryphonectria hypovirus*) и относящихся к семейству *Hypoviridae* [Hillman et al. 1994].

Особенности организации генома самых распространенных представителей данного семейства, а именно CHV1-EP713 и CHV1-Euro7, довольно хорошо изучены. Геном этих вирусов представлен двуспиральной молекулой РНК (дсРНК) состоящей из 12 712 н. п., содержит 3'-поли-(А) концевой фрагмент и с 5'-конца нетранслируемую лидирующую последовательность в 495 н.п., за которой следуют два смежных фрагмента – ORF А и ORF В (ORF – open reading frame, открытая рамка считывания). Место соединения двух ORF фрагментов представлено последовательностью 5'-UAAUG-3', где UAA является терминальным кодоном ORF А, а AUG – инициальным кодоном ORF В [Shapira et al. 1991, Chen and Nuss 1999].

При проведении данного исследования были использованы штаммы *Cryphonectria parasitica* выделенные из образцов коры каштана, собранных на территории Турции в Бартинской и Зангулдакской областях. В чистые культуры штаммы были выведены в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН. Всего удалось выявить 21 штамм, которые впоследствии были помещены на длительное хранение во всероссийскую коллекцию микроорганизмов (ВКМ).

Выделение в чистые культуры производилось по следующему методу: небольшие кусочки коры после поверхностной стерилизации инкубировали в чашках Петри на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 25°C. Через 3-10 дней выросшие колонии микроорганизмов отсеивались в отдельные чашки Петри для последующей идентификации. Для проведения последующих экспериментов выделенные чистые культуры штаммы *C. parasitica* выращивались в чашках Петри при комнатной температуре на среде КГАмб (картофельно-глюкозный агар с добавлением метионина и биотина) в течение 15 дней.

По внешним, макроморфологическим признакам штаммы были подразделены на

* © Белов А.А.

три группы: первая группа характеризовалась быстрым радиальным ростом, обильным спороношением и высоким уровнем пигментации; вторая группа представлена быстрорастущими штаммами, с очень низким уровнем пигментации и отсутствием спороношения; представители третьей группы (к ней отнесли всего два штамма) характеризовались медленным ростом, отсутствием спороношения и пигментации.

Выделение нуклеиновых кислот из штаммов *C. parasitica* производили с использованием стандартных наборов для выделения ДНК на основе гуанидинтиоцианата производства компании «Биоком».

Для постановки ПЦР были использованы сухие наборы реагентов серии «PCR-Соге» (Компания «Биоком»). Амплификация проводилась на амплификаторе «Терцик» (компания «ДНК-технология») по следующей программе:

1. денатурация – 3 мин/94°C;
2. амплификация – 40 циклов, включающих 1) 40 сек/94°C, 2) 100 сек/61°C, 3) 40 сек/72°C;
3. конечное удлинение – 3 мин/72°C.

Детектирование продуктов амплификации проводилось методом электрофореза в агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

В качестве мишени было выбрано два участка вирусного генома, расположенных на ORF В. Особенность данной области состоит в том, что на ней располагаются участки кодирующие вирусную РНК-полимеразу [Koonin, et al. 1991, Fahima et al. 1994] и хеликазу [Shapira et al. 1991], мотивы которых присутствуют у основных представителей семейства *Hypoviridae*. Для каждого участка были подобраны соответствующие праймеры: на участок гена РНК-полимеразы (последовательность – 5'-6180 – 6692-3'):

CHV2-F – CACTGGTGTTTGCGTGACAC

CHV2-R – CCCCACCATCTTGGTCATAG;

И праймеры на участок гена хеликазы (последовательность – 5'-11293 – 11628-3'):

CHV3-F – CGGAACTGCCGTACATGTCA

CHV3-R – ACCCACATCCCATCACAAGG;

Результат проведения ПЦР на праймеры CHV2 и CHV3 показаны на рис. 1.

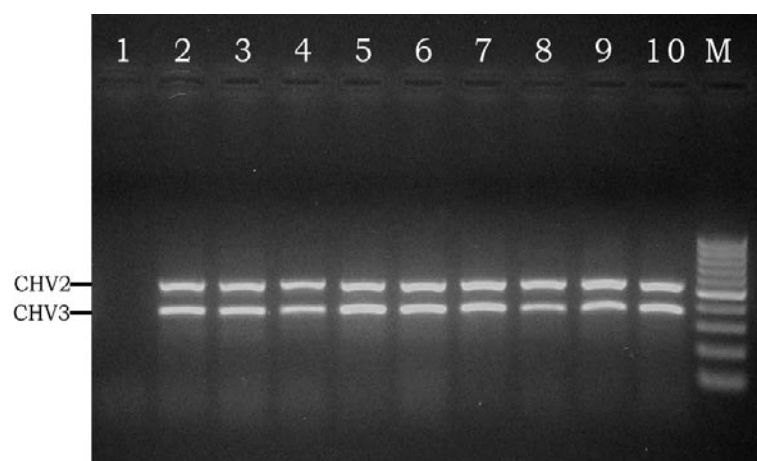


Рисунок 1. ПЦР анализ штаммов *C. parasitica* на праймеры CHV2 и CHV3.

1 – отрицательный контроль.

Штаммы (номера ВКМ):

2 – FW-3141; 3 – FW-3148; 4 – FW-3138; 5 – FW-3143; 6 – FW-3144; 7 – FW-3140; 8 – FW-3150; 9 – FW-3139; 10 – FW-3149.

M – маркер мол масс.

Как следует из полученных данных, ПЦР продукты были получены лишь для 9 штаммов из 21. Все девять штаммов по своим макроморфологическим признакам относятся ко второй и третьей группам. Следовательно, выявленные морфологические различия между тремя группами штаммов *C. parasitica* вызваны присутствием вируса в клетках гриба. Эти результаты подтверждают ранее полученные данные о том, что морфологические изменения (замедленный рост, низкий уровень пигментации и отсутствие

спороношения) являются характерным признаком гиповирулентных штаммов, вызываемые влиянием CHV вируса на протекающие в клетках гриба молекулярные процессы. Разработанная нами методика существенно расширяет возможности разработанной ранее экспресс-диагностики крифонеброза каштана [Попов А.П. и др. 2007] и позволяет получить более детальное представление о характере поражения растений и перспективах его существования.

Автор выражает глубокую благодарность профессору Аллахвердиеву С.Р. за содействие в получении образцов коры каштана. А также сотрудникам ИБФМ им. Г. К. Скрыбина РАН, заведующей лабораторией мицелиальных грибов к.б.н. С.М. Озерской и старшему научному сотруднику к.б.н. Н.Е.Иванушкиной, за содействие в выделении гриба в чистую культуру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Пасечник В.В., Коничев А.С., Аллахвердиев С.Р., Цветков И.Л., Снисаренко Т.А., Попов А.П., Коничева А.П., Белов А.А. Рак каштана: история распространения, биохимические основы экспрессии и перспективы преодоления. // Вестник МГОУ. Труды Центра фундаментальных научных исследований. 2006; 1: С. 5-12.
2. Попов А.П., Коничев А.С., Цветков И.Л., Аллахвердиев С.Р., Кырдар Э., Гюндюз Г., Атик Г.А. Разработка тест-системы для диагностики эндотиевого рака каштана методом ПЦР. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2007; 1: 7-11.
3. Придня М.В. Состояние популяции европейского и американского каштана в связи с крифонеброзом и пути их оздоровления // Электронный журнал «Исследовано в России». 2005; <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2003/032.pdf>.
4. Chen B, Nuss DL. Infectious cDNA Clone of Hypovirus CHV1-Euro7: a Comparative Virology Approach To Investigate Virus-Mediated Hypovirulence of the Chestnut Blight Fungus *Cryphonectria parasitica*. // Journal of Virology. 1999; 73(2): 985-92.
5. Hillman, B.I., B.T. Halpern, and M.P. Brown. A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. //Virology 1994; 201:241-250.
6. Koonin, E. V., G. H. Choi, D. L. Nuss, R. Shapira, and J. C. Carrington. Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:10647–10651.
7. MacDonald WL, Double ML. // Restoration of American Chestnut To Forest Lands - Proceedings of a Conference and Workshop. May 4-6, 2004, The North Carolina Arboretum. Natural Resources Report NPS/NCR/CUE/NRR - 2006/001, National Park Service. Washington, DC. 2006; 87-95.
8. Shapira R, Choi GH, Nuss DL. Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight // The EMBO Journal. 1991; 10(4): 731-9.
9. T. Fahima, Y. Wu, L. Zhang, and N. K. Van Alfen. Identification of the Putative RNA Polymerase of *Cryphonectria Hypovirus* in a Solubilized Replication Complex// Journal of Virology. 1994; Sept: 6116-6119.

A. Belov

IDENTIFICATION OF CRYPHONECTRIA HYPOVIRUS IN CRYPHONECTRIA PARASITICA STRAINS BY POLYMERASE CHAIN REACTION.

Abstract: 21 strain of *Cryphonectria parasitica* (Murril 1906) Barr 1978 was isolated in pure culture from bark of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). 9 strains with symptoms of altered virulence – hypovirulence – were identified using PCR. Hypovirulence was caused by presence of double-stranded RNA of *Cryphonectria hypovirus* (CHV). These findings extend capabilities of chestnut blight rapid diagnostic method.

Key words: CHV, *Cryphonectria parasitica*, *Castanea sativa*, PCR.