УДК 632.38:634.2

ОЦІНКА РІВНЯ АСОЦІАЦІЇ МІЖ ВІРУСАМИ ПРИ МУЛЬТИВІРУСНОМУ ІНФІКУВАННІ НАСАДЖЕНЬ ВИШНІ ТА ЧЕРЕШНІ

Тряпіцина Н.В.

Інститут садівництва УААН
вул. Садова, 23, Новосілки, Київ-27, 03027, Україна
E-mail: tryapic@justice.com

Запропоновано статистичну модель для оцінки рівня асоціації між вірусами рослин при мультивірусному інфікуванні. Розраховано та проаналізовано індекси асоціації трьох вірусів, що переносяться з пилком, на прикладі культур вишні та черешні.

Ключові слова: *віруси плодових культур, вишня, черешня, моніторинг, мультивірусне інфікування, статистична модель.*

Розповсюдження в насадженнях кісточкових культур вірусів, які вражають декілька культур (мають різних господарів) ставить ряд питань, центральним з яких є питання випадковості інфікування господаря. Об'єктивна оцінка розповсюдження того чи іншого вірусу в насадженнях різних культур може бути використаною для оцінки ризиків багатовекторних наслідків такого розповсюдження, зокрема: для виявлення культур або сортів, які є основними мішенями для даного вірусу або є резерватором вірусу, а також для виявлення асоціативних зв'язків між вірусами для екстраполяції ескалаційних наслідків коінфікування.

Дана робота є спробою створення зручної статистичної моделі з оцінки рівня асоціації між різними вірусними інфекціями з метою систематизації моніторингових даних щодо розповсюдження у вітчизняних насадженнях вишні та черешні трьох вірусів: неповірусу скручування листя черешні (ВСЛЧ) та іларвірусів – вірусу некротичної кільцевої плямистості (ВНКП) та вірусу карликовості сливи (ВКС). На сьогодні для цих вірусів не відомі специфічні переносники, їх розповсюдження в насадженнях відбувається в однаковий природний спосіб – завдяки перенесенню пилку запилюючими комахами.

Створення такої моделі дозволить оцінити характер взаємодії означених патогенів у природних умовах у насадженнях вишні та

черешні, зокрема, рівень випадковості комплексного інфікування двох культур і рівень асоціації між цими вірусами, та відповідним чином відкорегувати тактику та стратегію щодо запобігання розповсюдженню цих вірусів у насадженнях.

Матеріали і методи. Системні моніторингові дослідження фітовірусологічного стану насаджень плодових та ягідних культур в Україні розпочато у 2004 році з моменту запровадження в лабораторії вірусології Інституту садівництва УААН сучасних методів діагностики, зокрема, методу імуноферментного аналізу (ІФА). Протягом цього часу обстежено насадження 36 сортів черешні та 6 сортів вишні в господарствах чотирьох областей України (Запорізької, Донецької, Вінницької, Київської) [1, 2, 3].

Імуноферментний аналіз проводили з використанням сертифікованих специфічних поліклональних антитіл за варіантом непрямого імуноферментного методу (DAS- Double Antibody Sandwich) [4].

Статистична модель для обчислення рівня інфікування, спричиненого механічним перенесенням вірусів. Для того, щоб зробити статистичну модель оцінки рівня асоціації між вірусними інфекціями адекватною умовам вирощування плодових культур, ми вирішили внести поправку на ризики розповсюдження всіх трьох вірусних інфекцій у насадженнях, пов'язані з використанням вірус-інфікованого підщепного та прищепного матеріалу, – величину F_{0i}.

Присвоїмо порядковий номер кожному І-тому вірусу. Нехай 1 – порядковий номер вірусу КС, 2 – вірусу НКП, 3 – вірусу СЛЧ. Відповідно до даних моніторингових обстежень маточних насаджень клонових підщеп черешнево-вишневої групи [1,2,3] поширеність або частота (frequency) трапляння у підщепному матеріалі вірусу карликовості сливи (F_{01}) складає 0,003; вірусу некротичної кільцевої плямистості (F_{02}) – 0,004 та вірусу скручування листя черешні (F_{03}) – 0,005.

Зрозуміло, що ці показники інфікованості у маточниках вегетативних підщеп спричинені виключно механічним перенесенням вірусів і відповідають рівню культури технологічних робіт, тому можуть певним чином відображати також і ризик механічного перенесення вірусів у прищепному матеріалі. Якщо виходити з припущення, що при розмноженні саджанців вишні та черешні використовували лише безвірусний прищепний матеріал, то мінімальний показник механічно спричиненого інфікування

прищепного матеріалу кожним з трьох вірусів буде приблизно таким самим, що і у підщепного матеріалу. Тоді теоретичні частоти інфікованості саджанців вишні та черешні при висадці можуть бути обрахованими із використанням відповідних формул ймовірності для незалежних сумісних подій [5]. А саме:

$$F(0_i + 0_i) = F(0_i) + F(0_i) - F(0_i 0_i) \quad (1)$$

Або: $$F(0_i + 0_i) = 2F(0_i) - F(0_i)^2 \quad (2)$$

Відповідні розрахунки дають наступні значення цих поправок:

$$F_{01}=0{,}0059991,\ F_{02}=0{,}007984,\ F_{03}=0{,}009975$$

Статистична модель для оцінки рівня асоціації між вірусними інфекціями. Нехай загальна кількість перевірених на наявність і-го вірусу зразків кожного господаря дорівнює N_k, де k=1,2,… n_k. Нехай також загальна кількість зразків кожного господаря, інфікованих і-тим вірусом складає $N_{ik.}$ У нашому випадку і=1, 2, 3, де 1 – порядковий номер вірусу КС, 2 – вірусу НКП, 3 – вірусу СЛЧ.

Введемо показники Nm_{ik} та Na_{ik}, що відображають кількість перевірених зразків, які виявилися інфікованими відповідно одним (моноінфекція) або декількома вірусами (асоційована інфекція). Тоді поширеність і-го вірусу або частота його трапляння, що спостерігається (F_{ik} obs) у господаря k можна описати наступною формулою:

$$F_{ik}\,obs = (Nm_{ik} + Na_{ik}) / N_k \quad (3)$$

Відповідно, поширеність або частота трапляння патогену, яка спричинена перенесенням пилку запилюючими комахами (F_{ik}), дорівнюватиме різниці між частотою інфікування окремим вірусом, що спостерігається (F_{ik}obs), та нульовою поправкою (F_{0i}), і матиме наступний вигляд:

$$F_{ik} = F_{ik}obs - F_{0i} \quad (4)$$

Виходячи з припущення про незалежне інфікування господарів різними патогенами, вірогідність того, що відібраний зразок буде інфікованим лише одним вірусом (p_{ik}) має наступний

вираз:

$$p_{ik} = F_{ik} \prod_{j \neq i} (1 - F_{jk}) \quad (5)$$

Вірогідність того, що зразок, інфікований одним вірусом, не буде інфікований жодним іншим вірусом у цьому випадку дорівнюватиме:

$$pm_{ik} = \prod_{j \neq i} (1 - F_{jk}) \quad (6)$$

Тоді вірогідність асоційованої інфікованості зразка, який вже інфіковано одним вірусом, дорівнюватиме:

$$pa_{ik} = 1 - \prod_{j \neq i} (1 - F_{jk}) \quad (7)$$

Таким чином, виходячи із гіпотези про незалежне інфікування кожним вірусом, тобто про відсутність асоціацій між вірусами при інфікуванні, кількість моноінфікованих рослин буде підкорятися біноміальному розподілу із випробуванням Fm_{ik} та вірогідністю pm_{ik}. Тоді індекс асоціації вірусів Ia_k можна представити як різницю між відношенням кількості зразків, інфікованих і-тим вірусом у комплексі з одним або декількома вірусами до загальної кількості зразків, інфікованих і-тим вірусом (Na_{ik}/N_{ik}) та вірогідністю асоційованої інфікованості (pa_{ik}):

$$Ia_k = Na_{ik}/ N_{ik} - pa_{ik} \quad (7)$$

Індекс асоціації може приймати значення від -1 до +1, віддзеркалюючи відповідно негативну або позитивну асоціацію між вірусами. Можна також тепер ввести класифікацію рівнів асоціації відповідно до значень індексу асоціації вірусів Ia_k за загальноприйнятою математичною класифікацією (табл. 1)

Таблиця 1. ***Класифікація рівнів асоціації вірусів***

Значення індексу асоціації вірусів (Ia_k)	Рівень асоціації
> ± 0.91	дуже сильний
± 0.71-0.90	сильний
± 0.51-0.70	помірний
± 0.21-0.50	слабкий
< ± 0.20	дуже слабкий

Зрозуміло, що така класифікація носить досить умовний

характер, адже відображає лише статистичний аспект взаємозв'язків. Очевидно, що реальний зміст сили таких взаємозв'язків може бути відкорегованим емпіричними спостереженнями.

Результати та їх обговорення. Питання рівня коінфікування різними вірусами одного і того ж господаря є одним з прогностичних питань, адже сьогодні вже відомо, що при високому рівні коінфікування двома чи декількома патогенами одного і того ж господаря, у останнього за рахунок підвищення рівня гетерозиготності у популяції збільшується частота тих алельних варіантів генів, які можуть підвищувати рівень чутливості господаря до патогенів [6]. Крім цього, існує феномен, який отримав назву "посилення схильності", коли інфікування певним патогеном робить господаря більш чутливим до іншого патогену. Таке явище спостерігається як для вірусів тварин [7], так і для вірусів рослин [8].

Тому введення такого поняття як індекс асоціації вірусних інфекцій для того чи іншого господаря (Ia_k) може бути доцільним з огляду на виявлення таких асоціацій, які відхиляються від нормального розподілу динамічного ряду, що дозволяє певним чином змоделювати наслідки коінфікування.

Результати розрахунків індексів асоціації за розробленою статистичною моделлю представлено у табл. 2.

Таблиця 2. ***Індекс асоціації вірусів КС, НКП, СЛЧ у насадженнях вишні та черешні***

Вірус	Індекс ассоціації	
	вишня	черешня
ВКС	0,164	-0,094
ВНКП	0,161	0,008
ВСЛЧ	0,167	-0,074

У всіх шести проаналізованих випадках виявлений тип асоціативних зв'язків між вірусами можна оцінити як дуже слабкий ($< \pm 0.20$). Іншими словами, відхилення від нульової гіпотези про незалежне і випадкове коінфікування насаджень вишні та черешні трьома вірусами є незначним. У вишні всі розраховані індекси асоціації є позитивними і майже однаковими за значенням. Дещо інакше виглядає ситуація у насадженнях черешні. Тут індекс асоціації приймає як негативні значення (ВКС та ВСЛЧ), так і

позитивне (ВНКП), але за значенням індексу асоціації ці зв'язки є ще менш вираженими, ніж у вишні. У підсумку можна стверджувати, що асоціативні зв'язки між вірусами у проаналізованих випадках є переважно позитивними (у 66 % випадків) і свідчать про незначне відхилення від нормального розподілу. У насадженнях черешні розповсюдження кожного з трьох вірусів скоріше тяжіє до моноекспансії. Індекси асоціації між вірусами в насадженнях вишні скоріше можуть свідчити про однорідність асоціативних зв'язків і про відсутність сталих асоціативних преференцій між вірусами.

Поза сумнівом є той факт, що мультивірусне інфікування як рослинних так і тваринних господарів є однією з основних причин еволюціонування вірусів, адже такі віруси або кооперуються у споживанні ресурсів господаря, або ж навпаки – змагаються за їх розподіл. Тобто співіснування декількох вірусів в одному і тому ж господарі обов'язково супроводжується змінами рівня їх вірулентності, крім цього, таке співіснування певним чином може сприяти генетичній неоднорідності самих вірусів, за рахунок обміну генетичним матеріалом між різними патогенами та їх лініями [9, 10, 11]. Очевидно, що таких змін з більшою вірогідністю можна очікувати у тих випадках мультивірусного інфікування, де індекс асоціації між вірусами є найвищим.

Кореляційний аналіз між розрахованими індексами асоціації та рівнем розповсюдженості відповідного вірусу в насадженнях вишні та черешні не дозволив виявити достовірних позитивних або негативних кореляцій. Тому в даному випадку не можна з очевидністю стверджувати, що розповсюдження того чи іншого із проаналізованих вірусів є менш або більш успішним при мультивірусному інфікуванні господаря.

Таким чином, розроблено статистичну модель, яка дозволяє оцінити відхилення від нульової гіпотези про незалежне і випадкове вірусне інфікування рослинних господарів.

Використання статистичної моделі на прикладі даних про рівень інфікованості насаджень вишні та черешні трьома рослинними вірусами, які переносяться пилком, дозволило оцінити рівень асоціації між цими вірусами як слабкий.

У переважній більшості проаналізованих випадків (66 %) індекс асоціації вірусів є позитивним.

Не виявлено достовірної кореляції між рівнем розповсюдження вірусів та їх індексами асоціації з іншими вірусами.

1. Васюта С.О. Новые сведения о распространении вирусов косточковых культур в Украине /С.О. Васюта, В.М. Удовиченко, Н.В. Тряпицина, Н.В. Грабовская, К.М. Удовиченко //Тези Міжнар. конф. "Біоресурси та віруси" (Київ, 10-13 вересня 2007 р.): тез.доп. – К., 2007. – С. 167.

2. Virus diseases of fruit crops in Ukraine /Udovychenko V. M., Tryapitcyna N.V.,Vasyuta S.O., Medvedeva T.V., Maliyenko V.A., Udovychenko K.M., Kondratenko P.V. //10th International Plant Virus Epidemiology Symposium "Controlling epidemics of emerging and established plant virus diseases – the way forward" (15-19 October 2007, ICRISAT Patancheru 502324,AP, India). – 2007. – P. 111.

3. Васюта С.О. Діагностика вірусів кісточкових культур методом імуноферментного аналізу /С.О. Васюта, Н.В. Тряпіцина //Садівництво: Міжвідомч. тематичн. наук. зб. – 2007. – Вип. 60. – С. 264-275.

4. Clark M.F. Characteristics of the microplate method of the enzyme – linked immunosorbent assay for the detection of plant virus /M.F. Clark, A.N. Adams //J.Gen.Virol. – 1977. – Vol. 34, № 3. – P. 475-483.

5. Гнеденко Б.В. Курс теории вероятностей /Б.В. Гнеденко.– М.: Наука, 1965.– С. 400.

6. McClelland E.E. Major histocompatibility complex heterozygote superiority during coinfection /E.E. McClelland, D.J. Penn, W.K. Potts //Infect. Immun. – 2003. – № 71. – P. 2079-2086.

7. Woolhouse M.E.J. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts /M.E.J. Woolhouse, J.P. Webster, E. Domingo, B. Charlesworth, B.R. Levin //Nat. Genet. – 2002. – № 32. – P. 569-577.

8. Schoeneweiss D.F. Predisposition, stress, and plant disease /D.F. Schoeneweiss //Annu. Rev.Phytopathol. – 1975. – № 13. – P. 193-211.

9. Malpica J.M. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus /J.M. Malpica, A. Fraile, I. Moreno, C.I. Obies, J.W. Drake, F. Garcya-Arenal //Genetics. – 2002. – № 162. – P. 1505-1511.

10. Garcya-Arenal F. Variation and evolution of plant virus populations /F. Garcya-Arenal, A. Fraile, J.M. Malpica //Int. Microbiol. – 2003. – № 6. – P. 225-232.

11. Alizon S. Decreased overall virulence in coinfected hosts leads to the persistence of virulent parasites /S. Alizon //Am. Nat. – 2008. – № 172. – P. 67-79.

ОЦЕНКА УРОВНЯ АССОЦИАЦИИ МЕЖДУ ВИРУСАМИ ПРИ МУЛЬТИВИРУСНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ НАСАЖДЕНИЙ ВИШНИ И ЧЕРЕШНИ

Тряпицына Н.В.

Институт садоводства УААН, г. Киев

Предложена статистическая модель для оценки уровня ассоциации между вирусами растений при мультивирусном инфицировании. Рассчитаны и проанализированы индексы ассоциации трех вирусов, которые переносятся пыльцой, на примере культур вишни и черешни.

Ключевые слова: *вирусы плодовых культур, вишня, черешня, мониторинг, мультивирусное инфицирование, статистическая модель.*

ESTIMATION OF ASSOCIATION LEVEL BETWEEN VIRUSES AT MULTI-HOST INFECTING OF SOUR AND SWEET CHERRY ORCHARDS

Tryapitcyna N.V.

Institute of Horticulture of UAAS, Kyiv

Statistical model for estimation of association level between viruses at multi-host infecting is offered. The association indexes of three pollen-born plant viruses for sweet and sour cherry crops are calculated and analysed.

Key words: *monitoring, multi-host infecting, sour cherry, sweet cherry, viruses of fruit crops.*