

УДК: 632.3:635-2:578.864

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ  
*TURNIP MOSAIC VIRUS* ИЗ РАСТЕНИЙ РОДА *BRASSICA* \*

И.А. ЗУБАРЕВА<sup>1</sup>, Т.Н. ГРИБОВА<sup>1</sup>, С.Г. МОНАХОС<sup>2</sup>, А.Н. ИГНАТОВ<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Центр «Биоинженерия» РАН;<sup>2</sup> РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева)

Обследовали четыре района Московской области на наличие культурных растений рода *Brassica* с симптомами поражения вирусом мозаики турнепса (*Turnip mosaic virus*). Из открытого и закрытого грунта отобрали 87 образцов растений с характерными симптомами заболевания. После классификации растительного материала по признакам поражения растений-хозяев, реакции растений-индикаторов и иммуноферментному анализу выделили 6 изолятов *TiMV* (12, 13a, 13b, 17, 18, 110). Для всех изолятов провели ОТ-ПЦР и секвенировали участки трех таксономически-информативных генов (*PI*, *Nib*, *CP*). Филогенетический анализ показал принадлежность изолятов к двум разным филогенетическим группам со сходством около 95%. Анализ последовательностей вместе с размещенными в Генбанке образцами вируса не выявил фактов рекомбинации, что говорит об их тональности.

*Ключевые слова:* *Turnip mosaic virus*, *Brassica*, ОТ-ПЦР, секвенирование, филогенетический анализ.

Вирус мозаики турнепса — *Turnip mosaic virus* (ТиМУ) относится к крупнейшему роду вирусов растений — *Potyviridae*, представленному 180 видами [11]. По распространенности вирусов в мире ТиМУ находится на втором месте, уступая лишь вирусу мозаики огурца, а в определенных странах, например Китае, он является самым распространенным возбудителем заболеваний многих сельскохозяйственных культур по сравнению с грибными или бактериальными патогенами [3, 16].

Вирус инфицирует все растения семейства капустные (*Brassicaceae* Burnett.), в т. ч. такие важные сельскохозяйственные культуры, как масличный рапс (*B. napus* L.), капуста белокочанная (*B. oleracea* L.), репа (*B. rapa* L.), турнепс (*B. rapa* L.), горчица (*B. juncea* L.) и др. При поражении растений происходит задержка в росте, ранняя дефолиация, снижение товарного вида кочанных и салатных форм, что приводит к большим экономическим потерям.

Вирион ТиМУ представляет собой извилистую капсулу с одно цепочечной плюс-цепью РНК [15]. В геноме ТиМУ содержится около 9830 п.о. [6, 7]. Трансляция вирусной РНК приводит к образованию одного большого полипротеина, который гидролизуется на десять белков: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, дву доменный белок NIa,

\* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ГК № 14.518.11.7042 и РФФИ 12-04-32084-мол а.

состоящий из терминального белка VPg и протеиназы NIa-Pro, белок Nib и белок оболочки CP [4, 14].

Популяция TuMV представлена многими группами, отличающимися по кругу восприимчивых к ним растений и вызываемым симптомам. Зарубежные ученые [2] использовали для дифференциации патотипов вируса 4 линии дифференциатора вида *Brassica napus* (рапс и брюква). Разделение реакции на три типа — иммунитет, локальное заражение и системное заражение — позволило разделить более 120 изученных изолятов на 12 патотипов, один из которых доминировал, и предложить систему дифференциаторов. Отмечено, что в Европе преобладают изоляты трех патотипов 1, 3 и 4, а в Азии — изоляты патотипов 3 и 7 [2]. Изоляты вируса также отличались генетически [6, 7, 8, 13].

Хотя несколько изолятов вируса из России были включены в исследования зарубежных ученых [13], генетическое разнообразие российской популяции патогена остается неизученным. Нами впервые была проведена оценка генетической изменчивости ряда изолятов вируса.

#### Материалы и методы

Отобранные растительные образцы из разных районов Московской обл. (г. Москва, Одинцовский р-н, Подольский р-н, Наро-Фоминский р-н) с симптомами заболевания TuMV включали в себя представителей *B. oleracea*, *B. rapa* subsp. *rapa*, *B. napus* и *B. rapa* subsp. *chinensis*.

Для идентификации и подтверждения наличия TuMV в имеющихся изолятах использовали растения-индикаторы вируса (*Nicotiana tabacum* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste, *Lactuca sativa* L., *Brassica rapa* L.), а также иммуноферментный анализ (ИФА).

ИФА в модификации Double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) с использованием поликлональных антител к TuMV в составе тест-системы NEOGEN (Великобритания) проводили согласно рекомендациям производителя.

Для определения вирулентных свойств изолятов проводили заражение 64 образцов хозяйственно ценных и диких видов растений семейства *Brassicaceae*, включающих несколько видов: *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. nigra*.

Все исследуемые образцы растений подвергали механической инокуляции в фазе 2-3 настоящих листьев по методике [2] в четырехкратной повторности.

Симптомы заболевания, такие как хлоротичная пятнистость, деформация листовых пластинок, хлороз жилки, угнетение роста и развития растения, оценивали визуально по 9-балльным шкалам с 7-дневным интервалом в течение 4 недель после инокуляции и подтверждали ИФА.

Для генетической характеристики изолятов выделяли тотальную РНК и с помощью реакции обратной транскрипции получали кДНК. Затем с использованием специфических пар праймеров амплифицировали и секвенировали в прямом и обратном направлениях фрагменты кДНК генов, кодирующих белки Р1 (праймеры F240 5' CCA CCG TCA CCA CAG TCG CC 3' и R623 5' ATA ATT GGT TGC TGC GCT CT 3'), Nib (F7428 5' TGA AAT ATG CAA CGC CAA TCG 3' и SR8144 5' GGC TGT CCG STA TTG TTT CC 3') и белок оболочки CP (F8975 5' AGC AAG ATG CGC GTG CCA AG 3' и R9508 5' ATT TGC GCC ACG CAG TGC TG 3'). Области секвенирования охватывали три «горячие точки» рекомбинаций геномов вируса [8, 13].

ПЦР проводили в объеме 15 мкл на амплификаторе Mastercycler personal (Eppendorf, Германия) с программой: преденатурация при 95 °С в течение 2 мин и 35 циклов 95 °С (40 с.) — 60 °С (40 с.) — 72 °С (45 с.), постплавление при темпе-

ратуре 72 °С (5 мин). Реакционная смесь включала 1х буфер для Taq полимеразы, 0,375 ед. Taq полимеразы Fermentas (5 ед./мкл), 0,3 мМ dNTPs, 3,3 мМ хлорида магния, 0,5-1 мкл кДНК-матрицы и 0,7 пкМ каждого праймера.

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли при помощи набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) по протоколу производителя. Нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 согласно инструкции производителя. Анализ наличия рекомбинации в последовательностях исследовали с помощью методов, реализованных в программе RDP3 [5].

Построение филогенетических деревьев проводили в программе MEGA5.0 [12] с использованием методов ближайших соседей (Neighbor-Joining) [10] и минимальной эволюции [8].

### Результаты и их обсуждение

Инфицированный растительный материал собирали в 4 районах Москвы и Московской обл. в ходе обследований посевов и посадок овощных и масличных капустных культур в открытом и закрытом грунте. Всего было собрано 87 образцов, которые классифицировали по признакам поражения на 11 типов. Результаты заражения растений-индикаторов и ИФА показали, что 6 из них были инфицированы TuMV.

Отобранные изоляты были получены из пораженных растений *B. oleracea* (12), *B. g. rapa* subsp *g. rapa* (13 a), *B. napus* (13b) из закрытого грунта и *B. rapa* subsp *chinensis* (17,18,110) из посадок в поле.

Далее все 6 изолятов использовали для механической инокуляции коллекции растений семейства *Brassicaceae* в условиях экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК).

По результатам оценки устойчивости коллекции растений рода *Brassica* выявлено, что изоляты вируса отличаются между собой по вирулентности. Наиболее агрессивным оказался изолят 13b, поражающий 49 образцов из 64, менее агрессивные изоляты, выделенные из *B. oleracea* и *B. g. rapa*, поражали 31 и 23 образца соответственно, а изоляты 17-110 инфицировали всего 4-6 образца. Кроме того, характер поражения растений изолятами 17, 18 и 110 отличался от симптомов, вызываемых изолятами 12,13a и 13b (рис. 1).

При заражении изолятом 12 наблюдались: хлоротичная пятнистость от 0 до 8 балл., морщинистость листьев от 0 до 4 балл., угнетение роста и развития растений; 13a — хлоротичная пятнистость на уровне 0-6 балл., морщинистость листьев 0-3 балл.; 13b — хлоротичная пятнистость 0-9 балл., морщинистость 0-5 балл., угнетение роста и развития растений. Изоляты 17-110 вызывали хлороз листьев на уровне 4-7 балл. Выявлены различия в способности изолятов инфицировать тех или иных представителей *Brassica*.

ИФА подтвердил результаты визуальной оценки и выявил дополнительно три толерантных (бессимптомных) образца растений.

Для проведения молекулярной характеристики из изолятов и контрольного образца (растение *Brassica*, не подвергавшееся заражению) выделили тотальную РНК и с помощью ОТ-ПЦР с использованием специфических пар праймеров, амплифицировали фрагменты кДНК генов *PI*, *Nib* (рис. 2) и *CP*.

Нуклеотидные последовательности участков трех генов сравнили с последовательностями базы данных GeneBank при помощи программы BLAST. В результате чего выделили последовательности четырех наиболее близких изоля-

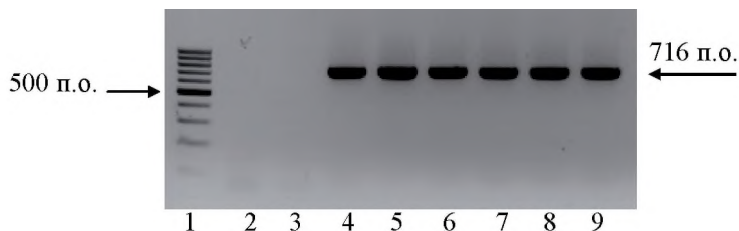


а



б

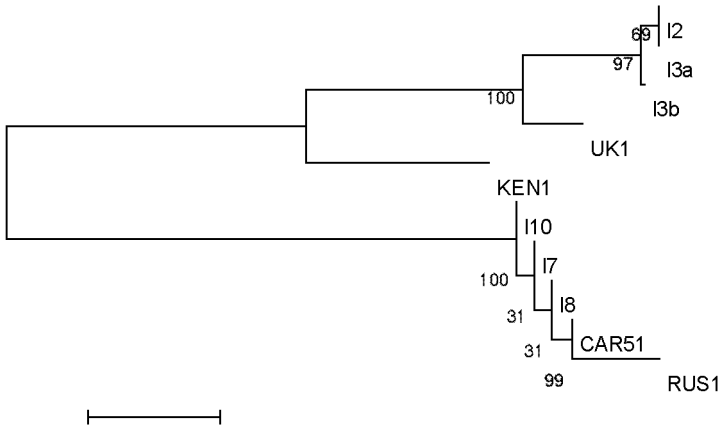
**Рис. 1.** Примеры зараженных вирусом TuMV листьев *B. napits.*: а — хлоротичная пятнистость при заражении изолятами 12-13, б — хлоротичная пятнистость при заражении изолятами 17-110



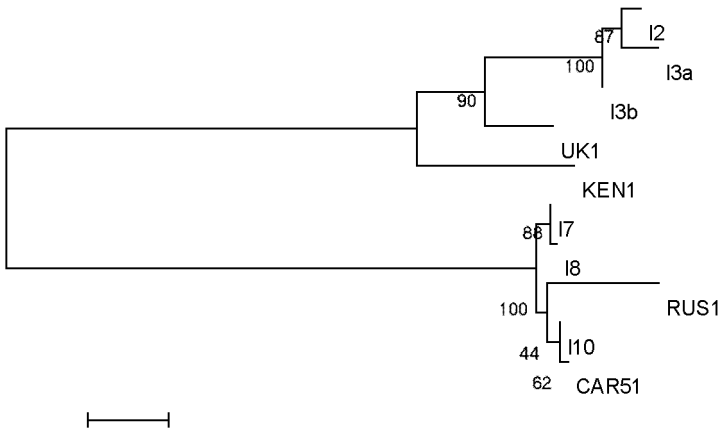
**Рис. 2.** Электрофоретический анализ в 1,5%-м агарозном геле продуктов ПЦР с праймерами на ген *Nib*: 1 — маркер молекулярной массы (Юобр Fermentas); 2 — отрицательный контроль (ПЦР без кДНК-матрицы); 3 — контроль, кДНЕС незараженного растения; 4-9 — ПЦР на препаратах кДНЕС изолятов i2,13a, 13b, 17,18,110 соответственно

тов TiMV - UK1, KEN1, RUS1 и CAR51 со сходством 97-99% с отдельными изучаемыми изолятами и построили филогенетические деревья как для отдельных генов (рис. 3), так и для суммарной последовательности кДНК (рис. 4). Топология деревьев по отдельным генам в основном совпадала с топологией, полученной по объединенным последовательностям всех трех генов.

Анализ деревьев показал для последовательностей всех 3 генов (*Nib*, *CP*, *PI*) наибольшую близость группы изолятов 12-13 к изолятам, выделенным из растений *B. napus* и *B. oleracea* в Великобритании и относящимся к 1-му патотипу (UK1, KEN1),



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, полученное с помощью метода минимальной эволюции [12], для гена *PI* изучаемых изолятов TuMV. Значения бутстрепа [1] для 1000 повторений даны у соответствующих узлов дерева. На шкале дано генетическое расстояние между последовательностями кДНК, определенное методом наибольшего правдоподобия [12]



**Рис. 4.** Филогенетическое дерево, полученное с помощью метода минимальной эволюции [12], для объединенных фрагментов трех генов изучаемых изолятов TuMV общей длиной 1650 нуклеотидов. Значения бутстрепа [1] для 1000 повторений даны у соответствующих узлов дерева. На шкале дано генетическое расстояние между последовательностями кДНК, определенное методом наибольшего правдоподобия [12]

в то время как группа изолятов 17-110 была близка к последовательностям изолятов, выделенным из *Armoracia rusticana* и *C. armoracia* в России и Польше и входящим в 5-й патотип (RUS1, CAR51).

Генетическое сходство между двумя группами изолятов было менее 95%, что сопоставимо с ранее описанным сходством групп изолятов вируса внутри данного вида в пределах 85-95% [9].

Анализ последовательностей с помощью методов, реализованных в программе RDP3, не выявил фактов рекомбинации в изучаемых изолятах по последовательности 3 анализируемых генов (*Nib*, *CP*, *PI*), что говорит об их клональности и возникновении в результате мутаций, а не рекомбинации. Таким образом, популяции вируса, поражающие растения капусты, рапса и турнепса в защищенном грунте, а также растения пекинской капусты в полевых условиях, принадлежат к разным генотипам и имеют различное происхождение.

#### Выводы

1. Проведена диагностика 87 образцов капустных культур с симптомами вирусной мозаики. На основании характера поражений индикаторных растений и результатов ИФА были определены 6 изолятов ТiМУ.

2. По результатам оценки устойчивости коллекции растений рода *Brassica* выявлено, что изоляты вируса отличаются между собой по вирулентности. Изоляты 12-13 отличаются от изолятов 17-110 по проявляемым симптомам на инфицированных растениях.

3. Сравнение нуклеотидных последовательностей участков трех генов (*Nib*, *CP*, *PI*) общей длиной 1650 п.о. показало, что изоляты отличаются не только от всех известных штаммов ТiМУ, но и между собой. При построении филогенетического дерева с использованием последовательностей наиболее близких штаммов было показано, что популяции вируса, поражающие растения капусты, рапса и турнепса в защищенном грунте, а также растения пекинской капусты в полевых условиях, принадлежат к разным генетическим группам и имеют различное независимое происхождение.

4. Анализ последовательностей не выявил фактов рекомбинации в изучаемых изолятах по последовательности 3 анализируемых генов, что говорит об их клональности и возникновении в результате мутаций, а не рекомбинации.

#### Библиографический список

1. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. III. 39. P. 783-791.
2. Jenner C.E., Walsh J.A. Pathotypic variation in Turnip mosaic virus with special reference to European isolates // *Plant Pathology*. 1996. \bl. 45. P. 848-856.
3. Lesmann D.-E., Vetten H.J. Occurrence of tobacco rattle and turnip mosaic virus in *Orchis* spp. and of an unidentified Potyvirus in *Cypripedium calceolus* // *ISHS Acta Horticulturae*. 1985. III. 164. P. 45-54.
4. Lu Y.W., Shen W.T., Zhou P., Tang Q.J. Complete genomic sequence of a Papaya ringspot virus isolate from Hainan Island, China // *Arch. virol*. 2008. УИ 153. P. 991-993.
5. Martin D.P., Lemey P., Lott M., Moulton V., Posada D., Lefevre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination // *Bioinformatics*. 2010. УИ 26. P. 2462-2463.
6. Nicolas O., Laliberte J.-F. Complete nucleotide sequence of Turnip mosaic potyvirus RNA // *General Virology*. 1992. III. 73. P. 2785-2793.
7. Ohshima K., Tanaka M., Sako N. Complete nucleotide sequence of Turnip mosaic virus RNA Japanese strain // *Arch. УИ*. 1996. Уо1. 141. P. 1991-1997.
8. Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota P., Hamamoto T., Tomimura K., Tan Z., Sano T., Azuhata F. Molecular evolution of turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread // *Gen. УИ*. 2002. Уо1. 83. №6. P. 1511-1521.

9. Rzhetsky A., Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1992. Vol. 9. P. 945-967.
10. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Molecular Biology and Evolution*. 1987. Vol. 4. P. 406-425.
11. Shukla D.D., Ward C.W., Brunt AA. *The Potyviridae*. UK: CAB International, 1994. 528 p.
12. 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 // *Molecular Biology and Evolution*. 2011. Vol. 28. P. 2731-2739.
13. Tomimura K., Gibbs A.J., Jenner C.E., Walsh J.A., Ohshima K. The phylogeny of Turnip mosaic virus; comparisons of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent 'emergence' in east Asia // *Mol Ecol*. 2003. Vol. 12. № 8. P. 2099-2111.
14. Urucuqui-Inchima S., Haenni A.L., Bernardi F. Potyvirus proteins: a wealth of functions // *Virus research*. —2001. Vol. 74. P. 157-175.
15. Walsh J. A., Jenner C. E. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance // *Mol. Plant Pathol*. 2002. Vol. 3. № 5. P. 289-300.
16. Walsh J.A., Jenner C.E. Resistance to Turnip mosaic virus in the Brassicaceae // *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses*. 2006. P. 415-430.

## THE MOLECULAR CHARACTERISTICS OF *TURNIP MOSAIC VIRUS* ISOLATES OBTAINED FROM *BRASSICA* PLANTS

I. A. ZUBAREVA<sup>1</sup>, T. N. GRIBOVA<sup>1</sup>, S. G. MONAKHOS<sup>2</sup>, A. N. IGNATOV<sup>1,2</sup>

<sup>0</sup> Center for Bioengineering RAS;

<sup>2</sup> Russian State Agrarian University — K. A. Timiryazev MAA)

*Four areas in Moscow region were surveyed for the presence of Brassica crops infected by Turnip mosaic virus (TuMV). A total of 87 samples were collected from plants with virus-like symptoms in open fields and greenhouses. Classification of the samples by host and indicator plants reaction, and ELISA grouped them into 11 classes. Six isolates of TuMV (12, 13a, 13b, 17, 18, 110) were obtained after all the tests. We conducted RT-PCR and sequenced three fragments of taxonomically-informative genes (PI, Nib, CP) for all of them. Phylogenetic analysis placed the isolates into two distinct phylogenetic groups with a similarity near 95%. Analysis of the sequences against all available Gene Bank accessions of TuMV has not found any evidence of recombination, indicating their clonal origin.*

*Key words: Turnip mosaic virus, Brassica, RT-PCR, sequencing, phylogenetic analysis.*

Зубарева Ирина Александровна — аспирант группы молекулярной фитопатологии Центра «Биоинженерия» РАН (117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 1; тел.: +79057375754; e-mail: i\_a\_zubareva@rambler.ru).

Грибова Татьяна Николаевна — к.б.н., ст.н.с. Центра «Биоинженерия» РАН Тел.: +79163225795; e-mail: patrik10@rambler.ru.

Монахос Сократ Григорьевич — к.б.н., ст.н.с., заведующий лабораторией генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева. Тел.: +79265623232; e-mail: cokrat@hotmail.ru.

Игнатов Александр Николаевич — д.б.н., руководитель группы молекулярной фитопатологии Центра «Биоинженерия» РАН, проф. кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: +79166712147; e-mail: an.ignatov@gmail.com.