

ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦИЯ И СЕМЕНОВОДСТВО, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Известия ТСХА, выпуск 2, 2013 год

УДК 632.3:635-2:578.864

ПЕРЕДАЧА ШТАММА 12 *TURNIP MOSAIC VIRUS* С СЕМЕНАМИ РАСТЕНИЙ РОДА *BRASSICA* *

НА. ЗУБАРЕВА¹, Т.Н. ГРИБОВА¹, С.Г. МОНАХОС², А.Н. ИГНАТОВ^{1,2}

(' Центр «Биоинженерия» РАН;² РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева)

Вирусы получили широкое распространение в природе, к настоящему времени известно достаточно много видов вирусов, вызывающих инфекционные болезни у растений. Вирус мозаики турнепса (TuALV) — единственный представитель Potyvirus, способный поражать растения рода *Brassica*. Вирусная инфекция при заражении растений через семена развивается значительно медленнее, чем при контактной или векторной передаче. Однако распространение вирусов с семенами имеет важные экономические последствия: зараженные семена по внешнему виду часто не отличаются от здоровых, с ними патоген может транспортироваться из страны в страну и создавать очаги первичной инфекции в поле. Для определения возможности передачи TuALV семенами с инфицированных вирусом восприимчивых и толерантных образцов *Brassica* были собраны семена, полученные из них растения диагностировали на зараженность TuALV визуальным методом, методом ПФА, ОТ-ПЦР и с использованием растений-индикаторов по методике Холмса с модификациями. Все методы диагностики показали наличие вируса в растениях с частотой передачи до 40%. С помощью выделения и индивидуальной диагностики зародышей семян была доказана передача вируса через заражение зародыша. Впервые установлена зависимость передачи штамма 12 TuALV с семенами от генотипа растения. Секвенирование фрагментов кДНК генов PI, Nib и CP обнаруживаемого в семенах вируса показало, что нуклеотидные последовательности идентичны исходному штамму 12, а сравнение их с последовательностями базы данных GeneBank выявило наиболее близкий изолят TuALV UK1 (Великобритания) с идентичностью на 99%.

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

Вирус мозаики турнепса (*Turnip mosaic virus* — TuMV) — представитель рода *Potyvirus* семейства *Polyviridae*, наиболее обширной группы растительных вирусов. Это один из наиболее важных представителей семейства, так как он заражает не ме-

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ГК № 14.518.7042 и РФФИ 12-04-32084-мол_а.

нее 318 видов растений-хозяев из 156 родов 43 семейств, включая все возделываемые, декоративные, дикорастущие и сорные виды капустных. По распространенности и вредоносности TuMV находится на втором месте, уступая лишь вирусу мозаики огурца, а в определенных странах, например Китае, он является самым опасным возбудителем заболеваний многих сельскохозяйственных культур, превосходя даже грибные и бактериальные патогены [11].

Накопление вирусных включений в хлоропластах приводит к потере или изменению пигментации, называемых хлорозом. Из-за вызываемой вирусом деформации снижается товарность продукции [7], а более тяжелые повреждения ведут к гибели растений [12]. В Центральной Азии, где выращиваются разновидности *B. gora*, вирус мозаики турнепса приводит к большим потерям урожая и снижает его качество. В Европе, где широко возделывают растения вида *B. oleracea* (капуста кочанная, цветная, брюссельская и брокколи), TuMV снижает качество продукции этих культур [8]. Общие потери урожая от TuMV составляют от 3,5 до 100% [1, 10, 12].

Примерно 14% известных вирусов растений передается через семена хотя бы на одном из растений-хозяев. Группа Потивирусов включает в себя 179 видов, из которых менее 10% передаются с семенами с частотой от 1 до 80%. В их число входят такие распространенные виды, как вирус мозаики сои (*Soybean mosaic virus*), вирус семян гороха (*Pea seed-borne mosaic virus*), вирус мозаики салата (*Lettuce mosaic virus*), вирус мозаики бобов (*Bean yellow mosaic virus*) и другие. В литературе имеется лишь одно упоминание об обнаружении TuMV в семенах *Raphanus raphanistrum* с частотой 4% [9], но факт заражения следующего поколения растений при этом показан не был.

Передача вируса с семенами имеет важные экономические последствия, так как обеспечивает наиболее опасный способ распространения и сохранения вирусной инфекции и создает очаги первичной инфекции при посеве/посадке растений в поле. Вирусы могут сохраняться в семени в течение длительного времени и распространяться на большие расстояния.

Вирусная инфекция может находиться на поверхности семян, в эндосперме или в самом зародыше. Передача вируса через поверхность семени или семенную кожуру происходит редко и встречаются только с вирусами очень устойчивыми к окружающей среде. Семена, содержащие вирус, не обязательно имеют внешние симптомы наличия вируса, но часто бывают более мелкого размера. Доля зараженных семян, полученных от зараженных растений, широко варьирует и не зависит от местоположения плода на растении или семени в плоде [6].

Некоторые вирусы, передающиеся семенами, имеют довольно широкий круг хозяев, но различные виды растений и даже сорта одного и того же вида растения-хозяина могут сильно отличаться по передаче вирусной инфекции. Процент зараженных эмбрионов будет тем выше, чем раньше материнское растение было заражено [5].

Поскольку растения семейства Капустные, восприимчивые к TuMV, редко дают жизнеспособные семена, и в то же время известны штаммы вируса, неспособные распространяться с насекомыми-переносчиками, нами было сделано предположение о возможной передаче TuMV с семенами толерантных (бессимптомных, но накапливающих вирус в тканях) растений, которое было подтверждено экспериментально.

Коллекцию растений семейства *Brassicaceae* из 64 хозяйственно ценных и дикорастущих образцов, включающую виды *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassicica oleracea* и *Brassica juncea*, механически инокулировали штаммом TuMV 12 в фазе 2-3 настоящих листьев по методике Jenner & Walsh [4] в четырехкратной повторности. Идентичность штамма, выделенного из пораженных растений *Brassica oleracea*, собранных на Селекционной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева была подтверждена иммуноферментным анализом, заражением растений рода *Brassica* и секвенированием фрагментов трех генов *PI*, *Nib* и *CP*, как описано ниже.

Для оптимального заражения и развития (распространения) вирусной инфекции в растениях в боксе Экспериментальной установки искусственного климата (ЭУИК) Центра «Биоинженерия» РАН постоянно поддерживали температуру 24 ± 1 °C. Симптомы заболевания сначала определяли визуально и оценивали по 9-балльной шкале с 7-дневным интервалом в течение 4 недель после инокуляции. Для подтверждения наличия вируса в растениях проводили иммуноферментный анализ методом двойного сэндвича ELISA (Double antibody sandwich (DAS)-ELISA) с использованием поликлональных антител к TuMV, входящих в состав тест-системы NEOGEN (Великобритания), согласно рекомендациям производителя.

Слабовосприимчивые образцы: яровой рапс (*B. napus*) Cobra spring (1); Галакти (5); CrGC 5.1 (10); № 423 (24); № 8 (26); Aomory (30); Aomory 1 (39); Патрик (45); горчица индийская (*B. juncea*) Лада (3а); Florida Broad Leaf mustard 1 (8а); и толерантный к вирусу образец *B. rapa* STT (7) довели до цветения, самоопылили и собрали семена.

Перед тестированием семян на наличие в них вирусной инфекции проводили поверхностное обеззараживание тремя способами: 70%-й этанол — 3 мин, 2%-й NaOCl — 10 мин, трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой — 5 мин; мирамистин — 10 мин, трехкратная промывка стерильной дистиллированной водой — 5 мин; прогрев семян в стерильной дистиллированной воде при 50 °C — 20 мин, а затем перемещение на 5 мин в холодную стерильную dH₂O.

Для установления механизма передачи вирусной инфекции из стерильных семян выделяли зародыши. Семена, предназначенные для выделения зародышей, увлажняли и отбирали нормально развитые, без некрозов и деформаций. Отобранные семена стерилизовали первым способом, в стерильных условиях раскладывали на влажные фильтры в чашках Петри и выдерживали в течение 24-36 ч, в зависимости от образца, в темноте при температуре 24 °C. Набухшие семена помещали по одному на стеклянную пластинку и препаровальной иглой надрывали оболочку семени в области зародыша, не повреждая последнего; стеклянной палочкой осторожно надавливали на середину семени, при этом зародыш выходил наружу. Выделенный зародыш переносили в пробирку со средой Гамборга [2]. Через 14 дней индивидуальные проростки из зародышей использовали для диагностики зараженности TuMV.

Для детекции TuMV в семенах, зародышах и взрослых растениях, выросших из семян, из растительного или семенного материала выделяли общую 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 гена *CP* (праймеры F260 5' ACTTCAGTGGCG-CAACCTAA3' и R623 5' ATAATTGGTTGCTGCGCTCT 3'), гена *Nib* (праймеры F7428 5' TGAAATATGCAACGCCAATCG 3' и SR8144 5' GGCTGTCCGCTATTGTTTCC 3')

и гена белка оболочки вируса *CP* (праймеры F8975 5' AGCAAGATGCGCGTGCCA-AG 3' и R9508 5' ATTTGCGCCACGCAGTGCTG 3').

ПЦР проводили в объеме 15 мкл на амплификаторе Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) со следующей программой: преденатурация при 95 °С в течение 2 мин, 35 циклов 95 °С (40 с) - 60 °С (40 с) - 72 °С (45 с), досинтез при температуре 72 °С (5 мин). Реакционная смесь была оптимизирована в предварительных экспериментах и включала 1 х буфер для Taq полимеразы, 0,375 ед. Taq полимеразы Fermentas (5 ед./мкл), 0,3 мМ dNTPs, 3,3 мМ хлорида магния, 0,5 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 PRISM 3730 согласно инструкции производителя.

Диагностику TuMV в растениях методом инокуляции семядольных листьев проводили по методике Холмса, предложенной для огурца [3]. Поскольку *Cucumis scitivus* не входит в круг растений-хозяев TuMV, в качестве индикаторного растения был взят другой представитель семейства Тыквенные — *Cucurbita pepo*, восприимчивый к данному вирусу.

Растения механически инокулировали в фазе появления первого настоящего листа в повторности 10 растений *C. pepo* (20 семядольных листьев) на 1 исследуемый образец. Перед инокуляцией горшки с проростками помещали в темноту на 12-16 ч при температуре 10 °С. Через 5-7 дней после заражения инокулированные листья срезали и помещали на несколько секунд в кипящую воду, затем экстрагировали хлорофилл погружением на 2-3 ч в 96%-й этанол при 40 °С. Обесцвеченные листья промывали дистиллированной водой и погружали на несколько секунд в раствор йода в йодистом калии. Крахмальные паранекрозы в точках заражения ранее невидимые после такой обработки проявлялись в виде мелких темно-синих пятен.

Результаты и их обсуждение

Из 64 образцов коллекции растений рода *Brctssicct*, инокулированных штаммом TuMV 12, 29 показали положительную реакцию на вирус по визуальной оценке, включая хлоротичную пятнистость до 8 баллов, морщинистость листьев до 4 баллов и угнетение роста и развития растений. Результаты визуальной оценки были подтверждены ИФА с использованием поликлональных антител к TuMV, кроме того, было выявлено два толерантных образца, т.е. несмотря на отсутствие внешних симптомов заражения в условиях эксперимента, вирус свободно реплицировался и распространялся по растению.

Со всех толерантных и слабовосприимчивых, достигнувших фазы цветения образцов после самоопыления были собраны семена. После предварительного обеззараживания семена были рендомизированно высажены в отдельные вазоны в изолированном боксе ЭУИК при соблюдении мер предосторожности против случайного перезаражения вирусом. Бокс изолировали от случайного проникновения насекомых-переносчиков, другие растения были удалены из него на все время эксперимента, а доступ постороннего персонала запрещен. При благоприятных для накопления вирусной инфекции в растениях условиях (24 °С) через 20-25 дней растения 6 образцов из 9 показали симптомы. При последующем снижении температуры до 18 °С симптомы исчезали в течение двух недель, что подтверждало толерантную и слабовоспри-

имчивую реакцию отобранных растений. Со всех образцов был собран материал для проверки наличия вируса другими методами.

ИФА и метод инокуляции семядольных листьев *C. pero* по Холмсу (рис. 1) показывают наличие TuMV в 8 образцах из 9 (в т.ч. одном толерантном к TuMV 12).



Рис. 1. Пример крахмальных паранекрозов на семядольных листьях *C. pero*, инокулированных: 1 — образцом, не содержащим TuMV; 2 — отрицательным контролем (здоровым растением); 3 — положительным контролем (штаммом 12); 4 — образцом, содержащим TuMV, переданный семенами

Наиболее чувствительный и точный метод из всех использованных нами, ОТ-ПЦР с парой специфичных праймеров на участок гена *PI*, также обнаружил положительную реакцию для растений 8 из 9 образцов (рис. 2).

Для обнаружения вируса в семенах изучаемых образцов пробы по 20 шт. каждого образца были взяты для ИФА и ОТ-ПЦР. ИФА выявил TuMV в 2 пробах (24 и 45 образцы), что свидетельствует о большой концентрации вируса в них. Причем, вероятно, накопление вирусной инфекции в семенах находится в обратной корреляции с восприимчивостью к вирусу образцов, так как 24 и 45 образцы поражались TuMV 12 на уровне 2-3 баллов.

ОТ-ПЦР показал наличие TuMV в пробах семян для 7 из 9 изучаемых образцов (рис. 3).

Для изучения механизма передачи семенной инфекции отбирали пробы по 10 семян каждого из четырех образцов (30, 45, 3а и 8а) для индивидуального анализа зародышей семян на присутствие в них TuMV методом ИФА, ОТ-ПЦР и методикой Холмса. Присутствие вируса в зародышах семян образцов 30 и 8а не было обнаружено ни одним из методов. Однако в зародышах семян образцов 45 (рис. 4) и 3а реакция

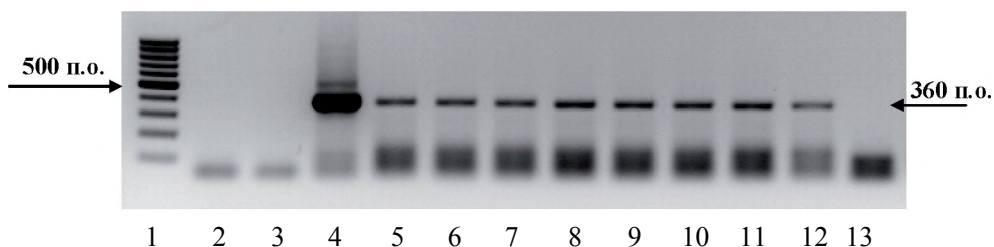


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 1,5%-м агарозном геле продуктов ПЦР с праймерами на ген *P1* 1 — маркер молекулярной массы (100bp Fermentas); 2 — отрицательный контроль (ПЦР без кДНК-матрицы); 3 — отрицательный контроль (кДНК незараженного растения); 4 — положительный контроль (кДНК TuMV 12); 5-13 — ПЦР на препаратах кДНК исследуемых образцов (1, 5, 10, 24, 26, 39, 47Т, 3а, 8а соответственно)

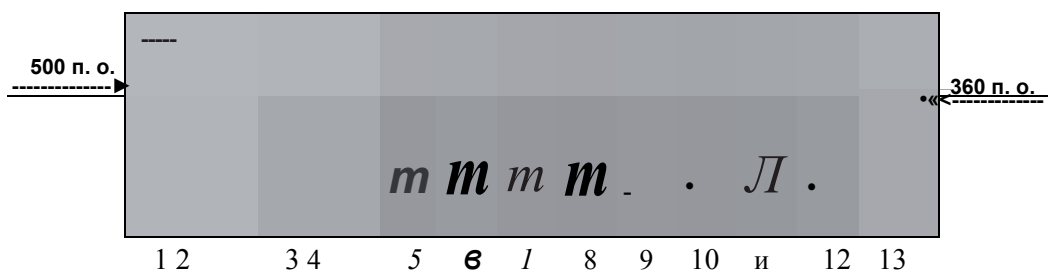


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 1,5%-м агарозном геле продуктов ПЦР с праймерами на ген *P1* 1 — маркер молекулярной массы (100bp Fermentas); 2 — положительный контроль (кДНК одного из инокулированных ранее образцов); 3 — отрицательный контроль (кДНК незараженного растения); 4 — положительный контроль (кДНК TuMV 12); 5-13 — ПЦР на препаратах кДНК исследуемых образцов (1, 5, 10, 24, 30, 39, 45, 3а, 8а соответственно)

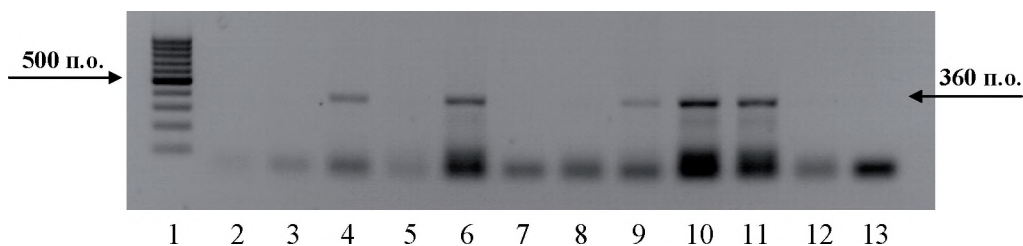


Рис. 4. Электрофоретический анализ в 1,5%-м агарозном геле продуктов ПЦР с праймерами на ген *P1* 1 — маркер молекулярной массы (100bp Fermentas); 2 — отрицательный контроль (ПЦР без кДНК-матрицы); 3 — отрицательный контроль (кДНК незараженного растения); 4 — положительный контроль (кДНК TuMV 12); 5-13 — ПЦР на препаратах кДНК зародышей образца 45

на вирус была положительной для всех используемых методов со средней частотой заражения соответственно 40 и 30%.

Для проведения молекулярной характеристики передаваемого семенами вируса из зараженных растений выделили тотальную РНК и с помощью ОТ-ПЦР с использованием специфических пар праймеров амплифицировали и секвенировали фрагменты к ДНК генов *PI*, *Nib* и *CP*.

Нуклеотидные последовательности участков трех генов вируса были идентичны исходному штамму 12, а сравнение их с последовательностями базы данных GeneBank при помощи программы BLAST выявило наиболее близкий изолят *TuMV* UK1 (Великобритания), с идентичностью на 99 %. Данный факт согласуется с информацией о первом появлении заболевания на Селекционной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева после испытания коллекции сортов *B. гора*, завезенной в Россию из Великобритании.

Выводы

1. Полученные в ходе эксперимента данные свидетельствуют о передаче *TuMV* 12 с семенами растений рода *Brassica*, зависимой от генотипа хозяина. Впервые показано присутствие вируса в зародыше семени.

2. С помощью ОТ-ПЦР вирус обнаруживается на всех стадиях развития растений (от семени и зародыша до взрослого растения). ИФА детектирует *TuMV* во взрослых растениях, а в зародышах и целых семенах — только при достижении высокой концентрации вирусных частиц.

3. Метод инокуляции семядольных листьев растений *C. репо* по Холмсу дает результаты, сопоставимые по чувствительности и надежности с другими методиками, на этом основании можно рекомендовать его для применения в качестве метода экспресс-диагностики *TuMV*.

4. Накопление вирусной инфекции в семенах находится в обратной зависимости от восприимчивости образцов к вирусу: чем ниже восприимчивость растения к вирусу, тем больше титр вируса в пробе семян.

Библиографический список

1. Ahlawat Y.S., Chenulu Losses due to radish mosaic caused by a strain of *Turnip mosaic virus* and its control // Indian Phytopathology. 1982. Vol. 35. № 2. P. 255-260.
2. Gamborg O., Miller R., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Experimental Cell Research. 1968. Vol. 50. P. 151-158.
3. Holmes F.O. Local lesions in tobacco mosaic // Bot. Gazette. 1929. Vol. 87. P. 39-55.
4. Jenner C.E., Walsh J.A. Pathotypic variation in *turnip mosaic virus* with special reference to European isolates // Plant Pathol. 1996. Vol. 45. P. 848-856.
5. Matthews R., Plant virology. UK: Bath Press, 2009. 1037 p.
6. Pacumbaba R.P. Seed transmission of soybean mosaic virus in mottled and nonmottled soybean seeds // Plant. Dis. 1995. Vol. 79. P. 193-195.
7. Shattuck VI. The Biology, Epidemiology, and Control of Turnip Mosaic Virus // Plant Breed Rev. 1992. Vol. 14. P. 199-238.
8. Tomlinson J.A. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables // Ann. Appl. Biol. 1987. Vol. 110. P. 661-681.
9. Tomlinson J.A., Walker V.M. Further studies on seed transmission in the ecology of some aphid-transmitted viruses // Ann. appl. Biol. 1973. Vol. 73. P. 293-298.

10. Walkey D.G.A., Pink D.A.C. Reactions of white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) to four different strains of Turnip mosaic virus // Ann. Appl. Biol. 1988. Vol. 112. P. 273-284.
11. Wdsh J.A., Jenner C.E. Resistance to Turnip mosaic virus in the Brassicaceae // Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses. 2006. P. 415-430.
12. Walsh J.A., Tomlinson J.A. Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) // Annals of Applied Biology. 1985. Vol. 107. P. 485-95.

SEED TRANSMISSION OF TURNIP MOSAIC VIRUS STRAIN 12 IN BRASSICA PLANTS

L.A. ZUBAREVA¹, T.N. GRIBOVA¹, S.G. MONAKHOS², A.N. IGNATOV^{1,2}

⁰ Center for Bioengineering RAS;
² RSAU-Timiryazev MAA)

Viruses are widespread in nature and many of them cause plant diseases. Turnip mosaic virus (TuAMV) is a member of genus Potyvirus in family Potyviridae and is the only potyvirus known to infect brassicas. When virus transmitted through seeds, the disease symptoms develop more slowly comparing to a vector-related infection. However, transmission of viruses through seeds of crop plants can cause very important economic consequences. Virus-infected seeds usually do not differ in appearance from healthy ones and the pathogen can be easily transported from one country to another, and provide sources of primary infection in field. Seeds of plants from several Brassica species were collected from TuAMV-susceptible and tolerant infected Brassica plants to determine the fact of virus transmission through the seeds. TuAMV presence in the seeds and obtained plantlets was identified by ELISA, RT-PCR and indicator plants reaction (by the Holmes' method). All diagnostic methods showed rate of TuAMV infection in seeds from 0 to 40% depending on plant variety. Individual embryos contained virus infection as well that shows the possibility of transmission through inner seed contamination. For the first time, we found plant-genotype depended transmission of TuAMV strain 12 with the seeds of brassicas. Sequencing of viral cDNA fragments of genes PI, Nib and CP for the virus detected in the seeds showed the nucleotide sequence identical to original strain 12. Search of the DNA sequences against the GeneBank showed their 99% identity to TuAMV isolate UK1.

Key words: Turnip mosaic virus, Brassica, RT-PCR, DAS-ELISA, sequencing.

Зубарева Ирина Александровна — аспирант группы молекулярной фитопатологии Центра «Биоинженерия» РАН (117312, г. Москва, проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 1; тел.: 8 (905) 737-57-54; e-mail: i_a_zubareva@rambler.ru).

Грибова Татьяна Николаевна — к. б. н., старший научный сотрудник Центра «Биоинженерия» РАН. Тел.: 8 (916) 322-57-95; e-mail: patrik10@rambler.m.

Монахос Сократ Григорьевич — к.б.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией генетики, селекции и биотехнологии овощных культур РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел.: 8 (926) 562-32-32; e-mail: sokrat@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.: 8 (916) 671-21-47; e-mail: an.ignatov@gmail.com.