

УДК 634.11+578.858+578.42

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ МЕТОДОМ ТРАВЯНИСТЫХ ИНДИКАТОРОВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА МОЗАИКИ ЯБЛОНИ

Н.Н. Волосевич¹, Н.В. Кухарчик¹, М. Cieslinska²

¹РУП «Институт плодоводства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: natallia.valasevich@rambler.ru, Kuchnataly@rambler.ru

²Научно-исследовательский институт садоводства,

Pomologiczna, 18, Skierniewice, 96-100, Польша,

e-mail: Mirosława.Cieslinska@inhort.pl

РЕЗЮМЕ

Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic virus*, ApMV) является одним из основных патогенов яблони. В качестве индикаторных растений для увеличения концентрации вируса мозаики яблони в растительной ткани, а также для его диагностики часто используют растения *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris* и *Catharantus roseus*. Поскольку вирус мозаики яблони из-за своей нестабильности тяжело переносится на растения травянистых индикаторов, представляло интерес оценить эффективность ряда стабилизаторов в буфере для переноса вируса из инфицированных листьев яблони на *C. quinoa*, а также перенести вирус с одного вида растения (*C. quinoa*) на другие индикаторы (*C. sativus*, *P. vulgaris* и *C. roseus*). При сравнении четырех буферов для инокуляции индикаторных растений *C. quinoa* не было отмечено различий в их эффективности. Несмотря на отсутствие специфичных симптомов ApMV инфекции на растениях-индикаторах, результаты SC-RT-PCR подтвердили перенос вируса с зараженных растений *C. quinoa* на индикаторы *C. sativus* и *P. vulgaris*.

Ключевые слова: травянистые индикаторы, яблоня, вирус мозаики яблони, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус мозаики яблони (*Apple mosaic virus*, ApMV) относится к роду *Parvivirus* и является одним из основных патогенов яблони. Вирус вызывает появление весной на первых развивающихся листьях ярко-желтых, позже бледно-желтых и белых полос, округлых или угловатых пятен, колец и окаймления жилок [1]. Большинство промышленных сортов яблони подвержены заражению, но различаются по степени развития симптомов. Потери продуктивности деревьев яблони, восприимчивых к вирусу мозаики сортов, могут составить до 60 %. Вирус распространен повсеместно, переносится механически, прививками, возможно пылью, но не переносится с помощью семян [2, 3].

В качестве индикаторных растений для увеличения концентрации вируса мозаики яблони в растительной ткани, а также для его диагностики часто используют растения *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris* и *Catharantus roseus*. Симптомами заражения вирусом мозаики яблони травянистых индикаторов *C. quinoa* являются бледная пятнистость, для *P. vulgaris* и *C. sativus* – хлоротические местные поражения, для *C. roseus* – системный хлороз [4].

Вирус мозаики яблони очень нестойкий, в неразведенном соке огурца сохраняет инфекционность только несколько минут, в буферном растворе, содержащем стабилизаторы, – несколько часов [1]. Такие вещества, входящие в состав клеток растений, как танины, белки, полисахариды и ферменты могут способствовать ингибированию вирусной инфекции. Поэтому для преодоления ингибиторного эффекта в качестве стабилизаторов часто используют сульфит натрия (антиоксидант), диэтилдитиокарбамат (ингибитор ферментов), никотин и 2-меркаптоэтанол. Добавление данных компонентов в буфер для инокуляции способствовало успешному переносу другого представителя рода *Parvivirus* вируса некротической кольцевой пятнистости сливы (PNRSV) с инфицированных растений *Prunus spp.* на *C. sativus* [5].

Поскольку вирус мозаики яблони из-за своей нестабильности тяжело переносится на растения травянистых индикаторов, представляло интерес оценить эффективность ряда стабилизаторов в буфере для переноса вируса из инфицированных листьев яблони на *C. quinoa*, а также перенести вирус с одного вида растения (*C. quinoa*) на другие индикаторы (*C. sativus*, *P. vulgaris* и *C. roseus*).

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа проводилась на базе лаборатории вирусологии Научно-исследовательского института садоводства в Скерневицах, Польша.

В качестве источника вируса для инокуляции травянистых индикаторов *C. quinoa* использовали листья яблони с ярко выраженными симптомами мозаики сортов Piros и Winter Rambour. Присутствие вируса в тканях растений подтверждали методом SC-RT-PCR с праймерами к МР-гену вируса. Для переноса вируса на индикаторные растения использовали 4 буфера для инокуляции (1 буфер/6 индикаторных растений). Состав буферов для инокуляции представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав буферов для инокуляции травянистых индикаторов

	Состав буфера
Буфер 1	0,1 М фосфатно-натриевый буфер (рН – 7,5) + 5 % PVP (поливинилпирролидон) + 0,12 % сульфит натрия
Буфер 2	0,06 М фосфатный буфер (рН – 7,5) + 0,2 М 2-МЕ (2-меркаптоэтанол) + 0,2 % диэтилдитиокарбамат
Буфер 3	0,03 М фосфатный буфер (рН – 8,0) + 0,2 М 2-МЕ (2-меркаптоэтанол)
Буфер 4	0,05 М фосфатный буфер (рН – 7,5) + 2 % никотин + 2 % PVP

Для переноса вируса на другие виды индикаторов (*P. vulgaris*, *C. sativus*, *C. roseus*) использовали буфер 1 для инокуляции (4 индикаторных растения/изолят). В качестве источника вируса использовали листья *C. quinoa*, инфицированные изолятами вируса мозаики яблони из яблони сортов Celica Welbo, Winter Rambour, Freyberg, Gruss am Mailand.

Индикаторные растения после инокуляции содержали в условиях климатической комнаты при температуре 22 °С±2 и фотопериоде 16:8 ч. В обоих опытах в течение 3 недель после инокуляции проводили визуальное обследование растений для обнаружения местных или системных симптомов вирусной инфекции, также наличие вируса в тканях индикаторных растений проверяли методом SC-RT-PCR с праймерами, специфичными к МР-гену вируса.

Выделение нуклеиновых кислот с помощью диоксида кремния (Silica Capture extraction, SC) [6, 7].

Листья яблони (200 мг) гомогенизировали в 4 мл PBS-ТРО буфера с помощью Tissue Homogeniser (Bio-Rad). В 1,5 мл эппендорфах смешивали 900 мкл L6 буфера и 40 мкл ресуспендированного диоксида кремния (Sigma). Интенсивно перемешивали при помощи Vortex (Bio-Rad). Клетки лизировали, добавляя 50 мкл гомогената к смеси буфера с диоксидом кремния, перемешивали при помощи Vortex, инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем центрифугировали 15 с при 12 000 оборотов/мин для осаждения клеточного дебриса. Супернатант удаляли.

Далее осуществляли двукратное промывание осадка путем добавления 900 мкл L2 буфера, перемешивания при помощи Vortex и центрифугирования в течение 15 с при 12 000 оборотов/мин. Супернатант удаляли. Затем осуществляли двукратное промывание осадка путем добавления 1 мл ледяного 70%-ного этанола, перемешивания при помощи Vortex и центрифугирования в течение 15 с при 12 000 оборотов/мин. Супернатант удаляли. Финальную промывку осадка проводили с помощью 1 мл ацетона, перемешивания при помощи Vortex и центрифугирования в течение 15 с при 12 000 оборотов/мин. Супернатант удаляли. Открытые пробирки с осадком высушивали путем инкубирования в течение 10 мин при 56 °С. Осадок ресуспендировали в 50 мкл стерильной воды, интенсивно перемешивали при помощи Vortex и инкубировали 10 мин при 56 °С, периодически перемешивая в процессе инкубирования. Затем интенсивно перемешивали при помощи Vortex и центрифугировали 2 мин при 12 000 оборотов/мин. Супернатант переносили в новые пробирки и хранили при -20 °С. Состав буферов для выделения нуклеиновых кислот представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Состав буферов для выделения нуклеиновых кислот

	Состав буфера
L2	60 г GuSCN на 50 мл 0,1 М Tris/Cl (pH 6,4)
L6	60 г GuSCN на 50 мл 0,1 М Tris/Cl (pH 6,4) + 11 мл 0,2 М EDTA (pH 8,0)
PBS-ТРО	2 г PVP-40 + 0,2 г овальбумина на 100 мл PBS-Т буфера
PBS-Т	8 г NaCl, 1,44 г Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O, 0,2 г KH ₂ PO ₄ , 0,2 г KCl на 1000 мл воды + 0,5 мл Tween 20 (pH 7,4)

RT-PCR метод. Для амплификации выделенных образцов использовали SuperScriptIII™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen).

Реакционная смесь для проведения RT-PCR имела следующий состав: 5 мкл 2 × буфера для RT-PCR; 0,2 мМ каждого праймера; 0,2 мкл RT/Platinum® Taq Mix; 0,25 мкг РНК. Общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл.

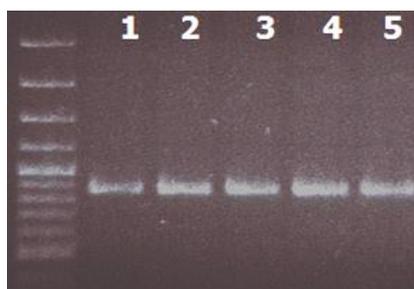
Температурные условия для RT-PCR были следующими: на этапе обратной транскрипции 47 °С – 30 мин, начальной денатурации 94 °С – 2 минуты; амплификация 40 циклов: 94 °С – 1 мин, 50 °С – 45 сек, 68 °С – 1 мин; финальная элонгация 68 °С – 5 минут.

MP-ген амплифицировали с использованием ApMVMPd/ApMVMPup праймеров [8]. Длина предполагаемого продукта амплификации 860 пн.

Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле и 0,5 × TBE-буфере.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходный материал для переноса вируса мозаики яблони из зараженных листьев яблони на растения травянистых индикаторов проверяли методом SC-RT-PCR с праймерами к гену белка движения вируса. В результате были получены продукты амплификации ожидаемого размера – 860 пн (рисунок 1).



Сорта: 1 – Piros, 2 – Winter Rambour, 3 – Celica Welbo, 4 – Freyberg, 5 – Gruss am Mailand

Рисунок 1 – Подтверждение наличия вируса в материале для инокуляции растений травянистых индикаторов.

Для опыта по сравнению эффективности буферов для инокуляции разного состава были отобраны два изолята вируса – из сортов яблони Piros и Winter Rambour. Четыре буфера для инокуляции отличались как концентрацией фосфатного буфера (0,03 М, 0,05 М, 0,06 М, 0,1 М), так и разным составом стабилизаторов (сульфит натрия, 2-меркаптоэтанол, диэтилдитиокарбамат и никотин).

При сравнении четырех буферов для инокуляции индикаторных растений *C. quinoa* не было отмечено различий в их эффективности, поскольку частота переноса вируса мозаики яблони была на одинаковом уровне и не превышала 20 %. Следует также отметить, что хотя присутствие вируса в тканях растений *C. quinoa* было подтверждено методом SC-RT-PCR, симптомы, появившиеся на листьях, были неспецифичны (рисунок 2А).

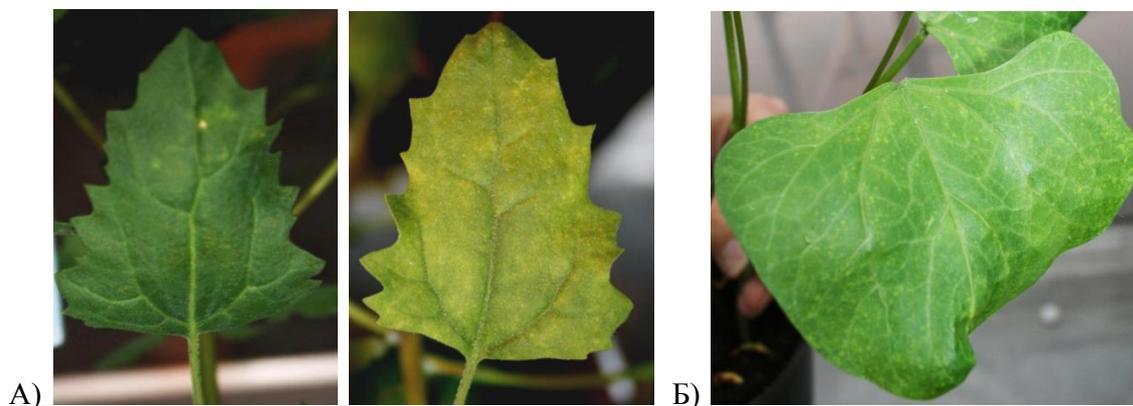


Рисунок 2 – Симптомы инфекции, отмеченные у растений *C. quinoa* (А) и *P. vulgaris* (Б).

Поскольку частота переноса вируса на индикаторные растения не зависела от состава буфера для инокуляции, то буфер 1 (как содержащий наименьшее количество вредных для здоровья компонентов) был выбран для дальнейших исследований по переносу вируса на три вида индикаторов: *P. vulgaris*, *C. sativus* и *C. roseus*.

Четыре изолята вируса из яблони сортов Celica Welbo, Winter Rambour, Freyberg и Gruss am Mailand были успешно перенесены с *C. quinoa* на растения *P. vulgaris*. Присутствие вируса в тканях растений *P. vulgaris* было подтверждено методом SC-RT-PCR, однако симптомы, появившиеся на листьях, были неспецифичны (рисунок 2Б). После инокуляции растений *C. sativus* присутствие вируса для всех четырех изолятов было подтверждено методом SC-RT-PCR, однако сама инфекция протекала бессимптомно. У растений *C. roseus* наличие вируса в тканях после инокуляции подтверждено не было.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований была оценена эффективность некоторых стабилизаторов в буфере для переноса вируса мозаики яблони из инфицированных листьев яблони на *C. quinoa*. Установлено, что частота переноса вируса при использовании стабилизаторов была на одинаковом уровне и не превышала 20 %, что согласуется с литературными данными, которые относят вирус мозаики яблони к тяжело переносимым на индикаторные растения из-за своей нестабильности.

Несмотря на отсутствие специфичных симптомов АрMV инфекции на растениях-индикаторах, результаты SC-RT-PCR подтвердили присутствие вируса в инокулированных растениях *C. sativus*, *P. vulgaris* и *C. quinoa*.

Литература

1. Вердеревская, Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т.Д. Вердеревская, В.Г. Маринеску. – Кишинёв: Штиинца, 1985. – 311 с.
2. Choi, S.H. Rapid Screening of *Apple mosaic virus* in Cultivated Apples by RT-PCR / S.H. Choi, K.H. Ryu // *Plant Pathol. J.* – 2003. – Vol. 19. – P. 159-161.
3. Postman, J.D. Apple mosaic virus in U.S. filbert germplasm / J.D. Postman, H.R. Cameron // *Plant Dis.* – 1987. – Vol. 71. – P. 944-945.
4. Akbaş, B. Widespread Distribution of *Apple mosaic virus* on Apple in Turkey / B. Akbaş, D. İlhan // *Plant Dis.* – 2005. – Vol. 89, № 9. – P. 1010.
5. Identification and partial characterization of *Prunus necrotic ringspot virus* on stone fruits in Jordan / N. Salem // *Journal of Plant Pathology.* – 2004. – Vol. 86, № 1. – P. 85-90.
6. Rapid and simple method for purification of nucleic acids / R. Boom [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 495-503.
7. Malinowski, T. Silicacapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (SC-RT-PCR): application for the detection of several plant viruses / T. Malinowski // *Diagnosis and identification of plant pathogens. Proc. 4th Int. EFPP Symposium, Bonn, 9-12 September 1996.* – Bonn, 1996. – P. 445-448.
8. Diversity of Apple mosaic virus Isolates in India Based on Coat Protein and Movement Protein Genes / V. Lakshmi [et al.] // *Indian J. Virol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 44-49.

BIOLOGICAL INDEXING USING HERBACEOUS INDICATOR PLANTS OF APPLE MOSAIC VIRUS ISOLATES

N.N. Volosevich, N.V. Kukharchik, M. Cieslinska

SUMMARY

Apple mosaic virus (ApMV) is one of the major pathogens infecting apple trees. *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus*, *Phaseolus vulgaris* and *Catharantus roseus* are often used as herbaceous indicator plants for multiplication of the virus in plant tissues and for the virus detection. It is difficult to transmit ApMV onto herbaceous plants due to an extreme instability of the virus. The aim of the research was to estimate the influence of buffer concentration and stabilizers on the transmission of the virus from apple leaves to *C. quinoa*, as well as to estimate the possibility of ApMV transmission from *C. quinoa* to indicator plants of *C. sativus*, *P. vulgaris* и *C. roseus*. The comparison of four inoculation buffers for transmission of the virus onto *C. quinoa* indicator plants showed that there was no difference on their affectivity. The results of SC-RT-PCR confirmed the transmission of the virus from *C. quinoa* to *C. sativus* и *P. vulgaris* plants in spite of the lack of specific symptoms of the infection.

Key words: herbaceous indicator plant, apple, apple mosaic virus, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 17.01.2014