

УДК 632.3.01/08:634.72

Е. В. КОЛБАНОВА, Н. Н. ВОЛОСЕВИЧ

РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОСАНИТАРНОГО МОНИТОРИНГА ВИРУСА РЕВЕРСИИ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ (*BLACKCURRANT REVERSION VIRUS*) В БЕЛАРУСИ

Институт плодоводства, аг. Самохваловичи, Беларусь, e-mail: belhort@it.org.by

(Поступила в редакцию 24.07.2014)

Введение. Вирус реверсии смородины черной (*Blackcurrant reversion virus*, BRV) относится к роду *Nepovirus* и является самым вредоносным вирусом смородины черной [1, 2]. Вирус распространен повсеместно и переносится почковым клещом *Cecidophyopsis ribis* [3, 4]. Типичными симптомами реверсии смородины являются изменение формы листовой пластинки, уменьшение опушенности почек и усиление окраски цветковых почек [5, 6]. Большинство промышленных сортов смородины черной подвержены заражению и незначительно различаются по степени развития симптомов. Потери продуктивности сортов смородины черной, восприимчивых к вирусу, могут составить 100 %. Кроме растений смородины черной вирус может поражать смородину красную (*R. rubrum*), однако симптомы инфекции обычно выражены слабее. Также сообщалось об обнаружении вируса в растениях смородины альпийской (*R. alpinum*) и смородины колосистой (*R. spicatum*). Крыжовник (*R. uva-crispa*) является иммунным к данному вирусу [3].

Снизить потери промышленных плантаций смородины черной от реверсии возможно только путем проведения комплекса мероприятий, таких как внедрение системы производства оздоровленного посадочного материала, обработка растений от почкового клеща при его миграции из почек в период цветения–начала формирования ягод и создание сортов смородины, устойчивых к вектору переноса заболевания – почковому клещу (путем скрещиваний с *R. dikuscha*, *R. nigrum* var. *sibiricum* и некоторыми другими видами смородины черной), либо использования комплексного иммунитета смородинно-крыжовниковых гибридов [7–9].

До недавнего времени стандартным методом обнаружения вируса BRV в растениях смородины черной являлся визуальный осмотр в течение двух-трех лет древесных растений-индикаторов рода *Ribes*, привитых почками с тестируемых растений. Этот способ диагностики реверсии является длительным, трудоемким и требует участия сотрудников, имеющих опыт визуальной оценки симптомов заболевания. В качестве альтернативы биологическому тестированию вируса реверсии с помощью индикаторных растений были предложены и успешно применены методики, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией. В отличие от тестирования с помощью древесных растений-индикаторов, ПЦР является более быстрым, дешевым и чувствительным методом определения вирусной инфекции [6, 10–12].

Цель исследования – установить с помощью метода молекулярного анализа уровень латентной инфекции вируса BRV в маточном насаждении супер-суперэлиты (ССЭ) класса А смородины черной РУП «Институт плодоводства» через 3 года после ее эксплуатации в открытом грунте.

Материалы и методы исследования. Фитосанитарный мониторинг вируса BRV проводили в маточном ССЭ насаждении класса А смородины черной в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» через 3 года после ее эксплуатации в открытом грунте. Для диагностики вируса были собраны листья со 135 визуально здоровых маточных растений 5 сортов смородины черной. В качестве положительного контроля использовали предварительно протестированные методом

IC-RT-PCR инфицированные растения сорта Память Вавилова с ярко выраженными симптомами инфекции. Растения положительного контроля использовали для сравнения симптомов, вызываемых вирусом BRV, с симптомами, описанными в литературе.

Наличие вируса в растительной ткани определяли методом ПЦР с обратной транскрипцией и связыванием вируса специфичными антителами (Immuno-capture-reverse transcriptase-polymerase chain reaction, IC-RT-PCR). Экстракцию вирусных частиц проводили с использованием специфичных к вирусу антител (immuno-capture extraction, IC) по методике, разработанной Lemmetty с соавт. (1998) [10]. BRV специфичные антитела для анализа были любезно предоставлены доктором Т. Malinowski из Института садоводства г. Скерневицы (Польша).

В ПЦР-пробирках объемом 200 мкл инкубировали 110 мкл раствора антител (1:1000) при 37 °С в течение 4 ч. ПЦР-пробирки трижды промывали 140 мкл PBS-Т буфера (8 г NaCl, 2,9 г Na₂HPO₄×12H₂O, 0,2 г KH₂PO₄, 0,2 г KCl, 0,5 мл Tween 20/1 л H₂O, pH 7,4). Клеточный сок растений получали путем растирания листьев с PBS-ТРО буфером (20 г PVP-40, 2 г овальбумина/1 л PBS-Т буфера) в соотношении 1:10. Гомогенизированный растительный экстракт (100 мкл) переносили в пробирки с антителами и инкубировали в течение ночи (18 ч) при температуре + 4 °С. Промывали пробирки 4 раза 140 мкл PBS-Т буфера и 1 раз 170 мкл стерильного 0,01 М Tris/Cl (pH 8,0) буфера, затем центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин для тщательного удаления остатков Tris/Cl буфера.

Аmplификацию выделенного образца проводили с использованием Titan One-Step RT-PCR Kit (Roche) на амплификаторе iCycler (BIO-RAD). Реакционная смесь для проведения RT-PCR имела следующий состав: 2 мкл 5×RT-PCR буфера, 6,3 мкл деионизированной H₂O, 0,4 мкл каждого праймера (10 мкМ), 0,2 мкл смеси dNTP (10 мкМ), 0,5 мкл DTT (10 мкМ), 0,2 мкл смеси ферментов. Общий объем реакционной смеси составлял 10 мкл. BRV-специфичные праймеры BRAV5/BRAV6 использовали для амплификации фрагмента 3' NTR области РНК-2 вируса [5]. Длина предполагаемого продукта амплификации 468 п. н.

Температурные условия для RT-PCR были следующими: на этапе обратной транскрипции при 50 °С – 30 мин, на этапе начальной денатурации при 94 °С – 2 мин; амплификация 10 циклов: при 94 °С – 10 с, при 60 °С – 30 с, при 68 °С – 45 с; амплификация 25 циклов с увеличением времени каждого последующего цикла на 5 с: при 94 °С – 10 с, при 60 °С – 30 с, при 68 °С – 45 с; финальная элонгация – при 68 °С – 7 мин. Продукты амплификации разделяли при помощи электрофореза в 1,6 %-ном агарозном геле и 0,5×TBE-буфере. Результаты электрофореза визуализировали при помощи УФ-иллюминатора GelDoc (BIO-RAD) и программного пакета Quantity One 4.5.

Результаты и их обсуждение. Реверсия черной смородины относится к заболеваниям с характерными внешними симптомами. Следует отметить, что симптомы поражения растений смородины черной сорта Память Вавилова вирусом BRV, наблюдаемые нами в условиях Беларуси, были сходны с симптомами вируса, описанными в литературе [12, 13]. Вирус BRV изменил внешний вид пораженных растений, в первую очередь форму листовых пластинок. Они стали трехлопастными, более плоскими, с меньшей выемкой у основания, наблюдалось уменьшение числа главных жилок, зубчики по краю листа стали более крупными, но редкими. Другим характерным симптомом заболевания реверсией являлись аномальные цветки. Цветки реверсионных кустов сорта Память Вавилова по сравнению с цветками здоровых растений имели яркую пигментацию из-за отсутствия опушения на чашелистиках, а количество лепестков увеличилось в несколько раз (рис. 1). Цветки пораженных вирусом растений смородины черной становились стерильными, что приводило к полной потере урожая.

Поскольку степень развития симптомов реверсии смородины черной значительно варьируется в зависимости от сорта и погодных условий, отсутствие симптомов при визуальном обследовании не является доказательством отсутствия вируса в растениях. Отсутствие латентной инфекции особенно важно для маточно-черенковых растений и может быть достоверно установлено только методами молекулярного анализа.

Одним из методов диагностики вируса реверсии, успешно применяемым для контроля данного патогена во всем мире, является метод IC-RT-PCR, обладающий необходимой чувствительностью и специфичностью для определения вируса в растительной ткани. Использование в ходе анализа



Рис. 1. Симптомы, вызванные вирусом BRV, на растениях смородины черной сорта Память Вавилова

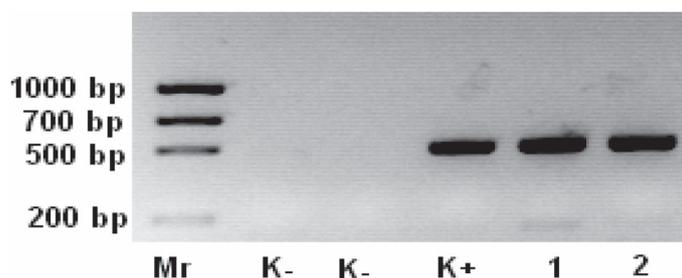


Рис. 2. Результат амплификации фрагмента генома белорусских изолятов вируса реверсии смородины черной. Mг – маркер молекулярных масс, K- (первый трек) – отрицательный контроль (вода вместо кДНК при амплификации), K- (второй трек) – отрицательный контроль (здоровое растение смородины черной), K+ – положительный контроль, треки 1 и 2 – образцы, выделенные из растений смородины черной сорта Добрыня без визуальных признаков инфекции

пары праймеров BRAV5/BRAV6, разработанных на основе известных нуклеотидных последовательностей изолятов вируса BRV из разных стран, а также разных видов смородины [14, 15], позволило амплифицировать фрагмент 3'-некодируемой области РНК-2 вируса размером 468 п. н. для белорусских изолятов вируса реверсии, выделенных из растений смородины черной (рис. 2).

Были протестированы маточные растения 5 сортов смородины черной, не проявляющие визуальных симптомов вирусной инфекции. Тестирование с использованием метода IC-RT-PCR позволило установить наличие латентной BRV инфекции в 6 растениях из 135 протестированных; доля зараженных растений составила 4,4 %. Из 5 обследованных сортов вирус был обнаружен в 4:



Рис. 3. Доля инфицированных вирусом BRV образцов смородины черной по сортам

в растениях сорта Память Вавилова, Титания, Клуссоновская и Добрыня. Установлено, что частота встречаемости вируса значительно варьируется в зависимости от сорта смородины черной (рис. 3).

В растениях сорта Клуссоновская вирус диагностировали в 1 (2,3 %) растении из 44 протестированных. В растениях сортов Титания и Память Вавилова вирус был зарегистрирован в 1 из 31 и 19 протестированных маточных растений (3,2 и 5,3 % соответственно). Наибольшая частота встречаемости вируса (16,7 %) в визуально здоровых растениях была отмечена у сорта Добрыня, у которого на каждые 6 тестируемых растений регистрировали 1 растение, инфицированное вирусом реверсии.

Выявленные инфицированные кусты смородины черной были уничтожены путем сжигания.

Заключение. В результате проведенных исследований было установлено, что симптомы поражения вирусом реверсии растений смородины черной в условиях Беларуси сходны с симптомами вируса, описанными в литературе. Показано, что отсутствие визуальных симптомов не является доказательством отсутствия вируса в растительной ткани. Установлено, что метод IC-RT-PCR с использованием праймеров BRAV5/BRAV6 может с успехом применяться для диагностики белорусских изолятов вируса BRV. Показано, что уровень латентной BRV инфекции растений смородины черной был низким и составил 4,4 %. Отмечено, что частота встречаемости вируса значительно варьируется в зависимости от сорта смородины черной.

Литература

1. Lemmetty A. et al. // *Phytopathology*. 1997. Vol. 87. P. 404–413.
2. Susi P. // *Mol. Plant Pathol.* 2004. Vol. 5. P. 167–173.
3. Latvala S. et al. // *Ann. of Appl. Biol.* 1997. Vol. 131. P. 283–295.
4. Jones A. T. // *Virus Res.* 2000. Vol. 71. P. 71–84.
5. Lemmetty A., Lehto K. // *Eur. J. of Plant Pathol.* 1999. Vol. 105. P. 297–301.
6. Jones A. T. // *Acta Horticulturae*. 2002. Vol. 585. P. 279–285.
7. Jones A. T., McGavin W. J. // *Ann. Appl. Biol.* 1996. Vol. 129. P. 47–55.
8. Огольцова Т. П. Селекция черной смородины – прошлое, настоящее и будущее. Тула, 1992. С. 380.
9. Trajkovski V., Anderson M. // *Plantsmann*. 1993. Vol. 15, N 2. P. 68–72.
10. Lemmetty A. et al. // *Acta Horticulture*. 1998. Vol. 471. P. 93–98.
11. Malinowski T. et al. // *Integrated Production of Soft Fruits IOBC/wprs Bull.* 2000. Vol. 23. P. 21–24.
12. Jones A. T., McGavin W. J. // *Plant Dis.* 2002. Vol. 86. P. 1333–1338.
13. Jones A. T. et al. // *Ann. Report of the Scot. Crop Res / Inst. Dundee (Scotland)*. 1996. P. 131–134.
14. Lehto K., Lemmetty A., Keränen M. // *Arch. of Virol.* 2004. Vol. 149. P. 1867–1875.
15. Příbylová J. et al. // *Eur. J. of Plant Pathol.* 2008. Vol. 121. P. 67–75.

E. V. KOLBANOVA, N. N. VALASEVICH

RESULTS OF PHYTOSANITARY MONITORING OF *BLACKCURRANT REVERSION VIRUS* IN BELARUS

Summary

The results of phytosanitary monitoring of *Blackcurrant reversion virus* on the three years old plants of black currant mother plantations (super-super elite, A class) grown in the field of the Department of Biotechnology of the Institute for Fruit Growing are presented in the paper. It was determined that IC-RT-PCR technique with primers BRAV5/BRAV6 can be successfully used for detection of Belarusian isolates of BRV. The estimated low level of latent BRV infection was 4.4 %. Occurrence of the virus varied on the cultivar of black currant.