УДК 578.4:578.864.(635.21)

© 2017

О.П. Таран,
кандидат біологічних наук

М.М. Лісовий,
доктор сільськогосподарських наук
Національний університет біоресурсів і природокористування України

О.І. Савіна,
доктор сільськогосподарських наук
Ужгородський національний університет

Л.Т. Міщенко,
доктор біологічних наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ОЦІНКА СТІЙКОСТІ РОСЛИН NICOTIANA TABACUM L. ТА NICOTIANA RUSTICA L. ДО НЕКРОТИЧНОГО І ЗВИЧАЙНОГО ШТАМІВ Y-ВІРУСУ КАРТОПЛІ

Мета. *Дослідження стійкості рослини сортів тютюну Nicotiana tabacum і махорки Nicotiana rustica за умов штучного інфікування некротичним і звичайним ізолятами Potato virus Y (PVY).* **Методи.** *Молекулярно-біологічні властивості ізолятів Potato virus Y установлювали методами трансмісійної електронної мікроскопії, мультиплексної зворотної полімеразно-ланцюгової реакції та ELISA. Біологічні властивості ізолятів досліджували методом рослин-індикаторів. Стійкість рослин культурних сортів тютюну та махорки до ізолятів PVY досліджували штучним інокулюванням із наступним візуальним виявленням симптомів інфікування та детекцією вірусів методом трансмісійної електронної мікроскопії та ELISA.* **Результати.** *Дослідження ізолятів Potato virus Y показали, що вони належать до різних штамових груп за реакцією на їх інфекцію, яка розвивалася у рослин-індикаторів. Мультиплексна ЗТ-ПЛР підтвердила наявність у цих ізолятах Potato virus Y та відсутність інших вірусів, що інфікують картоплю. Виявлено різну реакцію рослин тютюну сортів Самсун 155 та Собалчський 34/40 на інокуляцію звичайним і некротичним ізолятами Potato virus Y. Методами трансмісійної електронної мікроскопії та ELISA підтвердили накопичення цього вірусу.* **Висновки.** *Рослини сортів Самсун 155 та Собалчський 34/40 відносно звичайного ізоляту виявили реакцію толерантності, ці сорти нестійкі до некротичного ізоляту. Відсутність симптомів у рослин махорки та тютюну сорту Собалчський 193 може свідчити про толерантну реакцію і про наявність стійкості до обох ізолятів.*

Ключові слова: *тютюн, стійкість, Y-вірус картоплі, некротичний ізолят, звичайний ізолят.*

Найбільш шкодочинним щодо культурних рослин є Y-вірус картоплі (PVY) — член роду *Potyvirus* родини *Potyviridae*, що може інфікувати картоплю, томати, тютюн, перець та інші рослини родини пасльонових. Штами вірусу можуть бути визначені за

симптомами, які виникають у рослинах-хазяях — картоплі й тютюні та за допомогою серологічних реакцій ізолятів. Нині виявлено 9 груп штамів PVY, але найчастіше розглядають 3 групи штамів: PVY^N, PVY^O і PVY^C [1].

Ізоляти, які належать до групи PVY^N, спричиняють важкі симптоми некрозу жилок у рослин тютюну *Nicotiana*, і в польових умовах можуть призвести до значного погіршення якості продукції цієї культури. На глобальному рівні Y-вірус картоплі, безумовно, є найбільш руйнівним вірусом тютюну. Останнє опитування CORESTA (Центр співпраці в галузі наукових досліджень стосовно тютюну) на наявність вірусів тютюну підтверджує цю ситуацію. Дослідження світової колекції сортів тютюну, створених на основі внутрішньовидового відбору, також підтвердили надзвичайну шкодочинність некротичних ізолятів вірусу [2]. Втрати внаслідок інфекції некротичних штамів вірусу зростають у багатьох країнах. Дія цього вірусу на сортотипи тютюну Берлі і Вірджинія виявляється в зменшенні розмірів і маси листків, висоти рослин і врожайності. Значний негативний вплив на врожайність тютюну відзначають за раннього інфікування рослин вірусом. У Чилі та Новій Зеландії значне інфікування культури тютюну призвело до зниження врожайності, що перевищувало 70%. Хімічна якість зібраної продукції тютюну знижується за інфікування PVY. Так, виявлено збільшення вмісту нікотину, норникотину, загального азоту, азоту нерозчинних кислот і нітратів [3].

Для того, щоб задовольнити сучасні потреби галузі виробництва тютюну і отримати очікуваний ефект від джерела стійкості, потрібно виявити групи сортів зі стабільною стійкістю в умовах жорсткого природного і штучного інфекційного фонів. Велике значення має одержання нових сортів із груповою стійкістю. Для успішної селекції в цій галузі потрібно створити вихідний матеріал із груповою стійкістю, який би повною мірою задовольнив зростаючі вимоги до продуктивності і забезпечив високий рівень пристосованості до несприятливих факторів зовнішнього середовища. Дослідження сортів з метою забезпечення нових джерел стійкості до основних патогенів залишається актуальним і необхідним [4].

Крім цього, дослідження штамів PVY має велике значення для розв'язання проблеми взаємодії вірусу та рослини-хазяїна. Реакція рослинного організму на стрес, спричинений інфекцією, забезпечує його виживання і зумовлює зміни в популяції вірусу, які мають віддалені наслідки. Виникнення нових варіантів патогену під впливом внутрішньоклітинних чинників рослини-хазяїна часто відбувається за загального переважання ординарних представників популяції, що не дає змоги швидко ідентифікувати ці нові варіанти. Проте в подальшому ситуація може змінюватися і, зважаючи, що швидкість мутацій РНК-вірусів оцінюють у порядку 1 мутація на 1 реплікацію геному, можна вважати, що більша частина вірусних часток усередині зараженого рослини-хазяїна може представляти унікальні генотипи [5]. Отже, дослідження штамового складу популяцій допомагають оцінити динаміку популяцій PVY і визначити нові ізоляти, які мають нові характеристики і структуру геному [6, 7].

Матеріали і методи досліджень. Нами оцінено стійкість рослин тютюну *N. tabacum* сортів Самсун 155, Sobalchsky 34/40, Sobalchsky 193 і махорки *N. rustica* сортів Matsui Field і Actec до некротичного та звичайного ізолятів PVY. Ізоляти було відібрано в польових умовах із рослин картоплі, яку культивували на території Київської області. Належність ізолятів до групи штамів PVY визначали біологічними випробуваннями на рослинах *N. bentamiana* та *N. tabacum* сорту Самсун.

Індикаторні рослини і дослідні рослини *N. tabacum* і *N. rustica* вирощували в теплиці за температури 25°С і 16-годинного світлового періоду. Використовували рослини тютюну для тестування у віці 4–6-ти листків. Інокулювали по 5 рослин на сорт соком інфікованих рослин у розведенні 1:2 у фосфатному буфері (PBS, 7,4). Контрольні рослини обробляли PBS (pH 7,4).

Рослини досліджували за допомогою DAS-ELISA, ЗТ-ПЛР і трансмісійної електронної мікроскопії. Загальну РНК виділяли з 5-ти г листків за методикою [8]. Мультиплексну зворотно-транскриптазну полімеразну ланцюгову реакцію, що містила визначення PVY, PVM, PVS, PVX, PLRV та віроїда веретеноподібності бульб картоплі, проводили за методикою [9].

Для визначення вірусів DAS-ELISA використовували поліклональну сироватку

до комплексу штамів PVY, яка містить антитіла до PVY^O і PVY^N та діагностикуми для визначення Potato virus M (PVM)і Potato leaf roll virus (PLRV) (LOEWE Biochemica GmbH, Німеччина). Результати було детектовано за довжин хвиль 405/630 нм із використанням рідера Termo Labsystems Opsis MR (США) та програмного забезпечення Dynex Revelation Quicklink [10]. Обробку даних оптичної щільності зразків було виконано за допомогою описової статистики, визначали середнє значення і стандартне відхилення. Поріг оптичної щільності, який відрізняє позитивні результати ферментативної реакції від величини фону, було визначено для кожної плати індивідуально, як рекомендовано виробником [11].

Морфологію вірусних частинок у соку рослин картоплі та тютюну було досліджено за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії з використанням мікроскопа JEM 1230 (JEOL, Японія). Застосовували негативне контрастування 2%-го розчину фосфорно-вольфрамової кислоти і 2%-го розчину урацил ацетату впродовж 2 хв [12].

Результати досліджень. Ізолят PVY^N на рослинах-індикаторах спричинив симптоми системного некрозу. Некрози розвивалися на міжжилковій тканині листка у вигляді світло-коричневих крапок, які з часом збільшувалися до невеликих світло-коричневих некротичних плям. На стеблах також з'являлися некротичні світло-коричневі смуги. На 11–12-й день після інокуляції листки з некрозами в'янули, в'янення розпочиналося з базальної частини листка та країв листкової пластинки. Листки засихали, в окремих випадках рослини гинули. Такі симптоми спричиняє інфекція некротичних штамів PVY [3].

У індикаторних рослин, інокульованих ізолятом PVY^O, не виявлено помітних симптомів інфекції. Загалом інфекція зумовила лише легку мозаїку та деяку деформацію міжжилкової тканини. З часом симптоми мозаїки зникали. Методом DAS-ELISA в зразках виявили антигени PVY, інших вірусів не було виявлено. Така реакція рослин на інфекцію PVY характерна для звичайних ізолятів вірусу [13].

Методом мультиплексної ЗТ-ПЛР у зразках індикаторних рослин *N.benthamiana,* інокульованих ізолятами PVY^O та PVY^N із рослин картоплі, виявили продукти ампліфікації

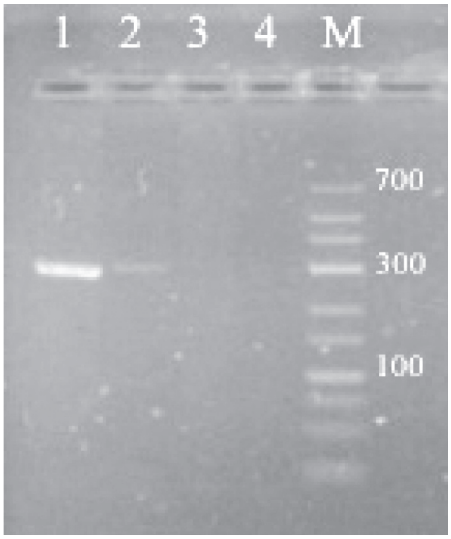


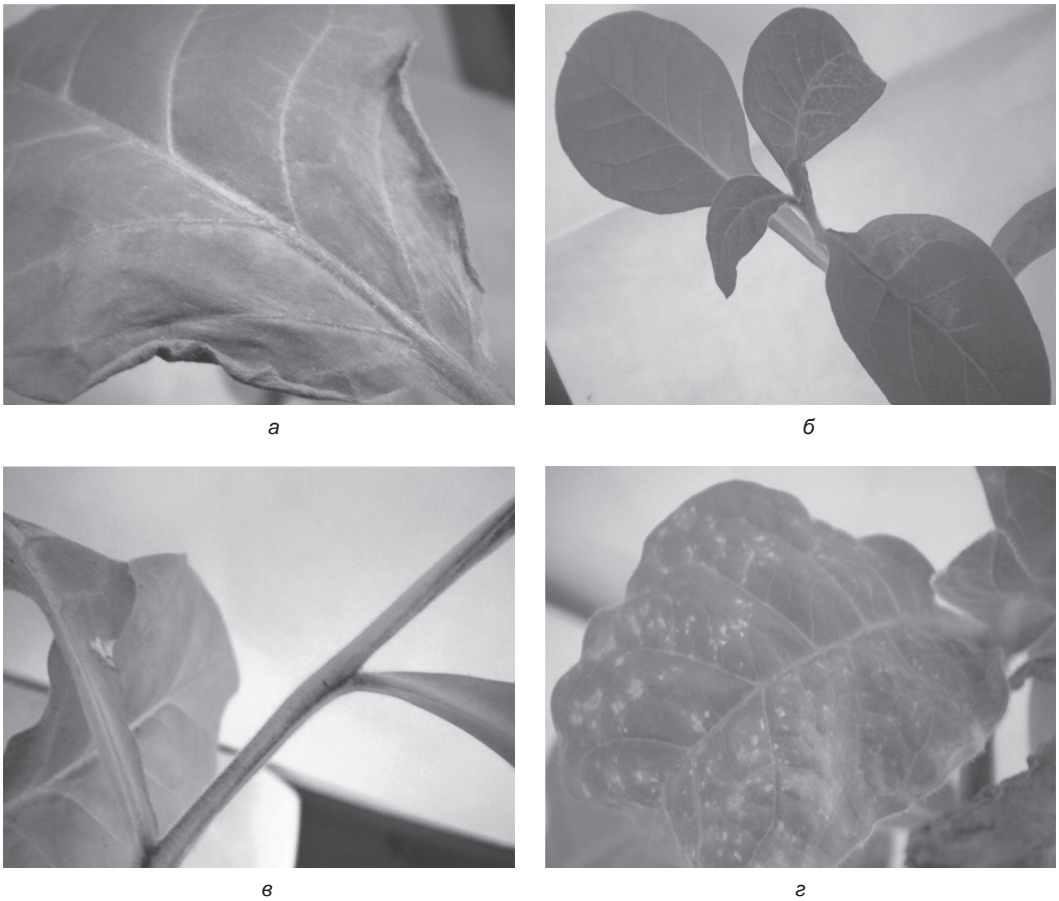
Рис. 1. Електрофореграма продуктів мультиплексної ЗТ-ПЛР визначення PVY, PVM, PVS, PVX, PLRV та віроїда веретеноподібності бульб картоплі в зразках рослин N. benthamiana, інфікованих PVY^O і PVY^N: треки 1, 2 — продукти ампліфікації PVY (365 п.н.), PVS (213 п.н.), PVX (411 п.н.); треки 3, 4 — продукти ампліфікації PVM (276 п.н.), PLRV (300 п.н.), PSTV (150 п.н.); M — маркер; зразки ізоляту PVY^O — треки 1 і 3; зразки ізоляту PVY^N — треки 2 і 4

кДНК до гена капсидного білка PVY (рис. 1).

Отже, використовувані ізоляти PVY належали до різних штамових груп і не містили інших вірусів.

Дослідження реакції рослин *N. tabacum* та *N. rustica* на інокуляцію виділеними ізолятами виявили таке. За інокуляції рослин тютюну сортів Самсун 155 та Собалчський 34/40 ізолятом PVY^N з'являлися симптоми некротизації жилок у базальній частині листкової пластинки. Потім некроз поширювався на черешки, іноді й на стебла рослин. Перші ознаки інфекції вірусу на рослинах *N. tabacum* сорту Самсун 155 виявили на 9-й день після інокуляції ізолятом PVY^N у вигляді посвітління жилок молодих листків (рис. 2, б). Системний некроз швидко поширювався по жилках листка, що спричиняло в'янення листкової пластинки та її засихання (рис. 2, а). Частина рослин цього сорту через 30 діб після інокуляції загинула.

Інокуляція рослин тютюну *N. tabacum* сорту Собалчський 34/40 ізолятом PVY^N також призводила до виникнення некрозів



а *б*

в *г*

Рис. 2. Симптоми інфікування рослин тютюну ізолятом PVY^N: а — некроз жилок та в'янення листкової пластинки у рослин тютюну сорту Самсун 155; б — системний некроз і посвітління жилок у рослин тютюну сорту Самсун 155; в — некроз стебел і черешків листків у рослин тютюну сорту Собалчський 34/40; г — точкові некрози і некроз центральної жилки в рослин тютюну сорту Собалчський 34/40

жилок, проте інфекція не призводила до загибелі рослини. Рослини, інфіковані некротичним ізолятом вірусу, тривалий час розвивалися, на молодих листках з'являлися симптоми некротизації, що свідчило про системну інфекцію.

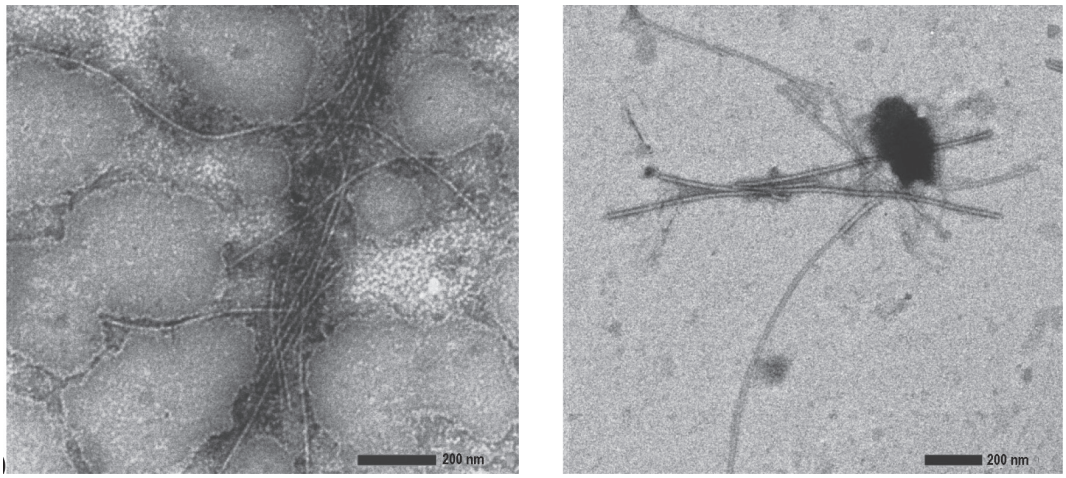
На відміну від цього, за інокуляції рослин цих сортів ізолятом PVY^O симптомів некрозу

1. Уміст антигенів вірусів у рослин N. tabacum, інокульованих ізолятами PVY

Сорт	Ізолят	PVY	PVM	PLRV
Собалчський 34/40	PVY^N	1,517±0,012	0,071±0,010	0,073±0,016
Собалчський 34/40	PVY^O	1,205±0,011	0,045±0,012	0,055±0,011
Самсун 155	PVY^N	1,015±0,009	0,053±0,010	0,059±0,014
Самсун 155	PVY^O	0,915±0,018	0,059±0,015	0,067±0,013
Контроль позитивний		1,013±0,015	0,617±0,09	0,425±0,011
Контроль негативний		0,045±0,010	0,045±0,010	0,045±0,09

а *б* *в*

Рис. 3. Рослини N. tabacum після інокуляції ізолятом PVY^O (19-й день): а — листок інокульованої рослини тютюну сорту Самсун 155; б — листок інокульованої рослини тютюну сорту Собалчський 34/40; в — контроль



а *б*

Рис. 4. Електронограма очищених препаратів ізолятів PVY з інокульованих рослин тютюну сорту Самсун 155: а — ізолят PVY^N; б — ізолят PVY^O

не виявлено (рис. 3). Рослини нормально розвивалися.

За результатами DAS-ELISA встановлено наявність антигенів PVY у рослинах обох сортів (табл. 1).

Методом трансмісійної електронної мікроскопії в листках рослин тютюну сортів Самсун 155 та Собалчський 34/40 виявлено ниткоподібні вірусні частки, морфологічно ідентичні PVY. Розміри часток становили 670–710 нм (рис. 4).

Виявлено різну реакцію рослин тютюну

2. Результати інокуляції рослин тютюну некротичнм і звичайним ізолятами PVY

Рослина	Сорт	PVY ізолят	
		PVY^N	PVY^O
Тютюн *N. tabacum*	Самсун 155	Нж, м	Лм
Тютюн *N. tabacum*	Собалчський 34/40	Нж, м	Без симптомів
Тютюн *N. tabacum*	Собалчський 193	Без симптомів	» »
Махорка *N. rustica*	Matsui Field	» »	» »
Махорка *N. rustica*	Actec	» »	» »

Примітка. Нж — некроз жилок, м — мозаїка, Лм — легка мозаїка.

сортів Самсун 155 і Собалчський 34/40 на інокуляцію звичайним і некротичним ізолятами PVY.

Інокуляція рослин *N. rustica* сортів Matsui Field і Actec та рослин тютюну сорту Собалчський 193 не призводила до видимих симптомів інфекції (табл. 2).

Отже, за результатами лабораторних аналізів, сорти тютюну *N. tabacum* cv. *Sobalchsky* 193 і махорки *N. rustica* cv. Matsui Field та cv. Actec можуть мати стійкість до некротичного штаму вірусу.

Висновки

Використання генетично стійких рослин є однією з найбільш ефективних, довготривалих і часто використовуваних стратегій у боротьбі з вірусними інфекціями в польових умовах. Виявлення нами сортів тютюну, які мають толерантність до інфікування важким некротичним ізолятом вірусу PVY, дає можливість використати їх для створення нових форм тютюну та проводити спрямовану селекцію щодо стійкості культури до цього небезпечного патогену.

Бібліографія

1. *The naming* of Potato virus Y strains infecting potato/R.P. Singh, J.P. Valkonen, S.M. Gray et al.// Arch. Virol. — 2008. — V. 153. — P. 1–13.

2. *Иванитский К.И.* Реакция сортов табака мировой коллекции на поражение болезнями в полевых условиях/К.И. Иванитский, В.А. Виноградов, И.И. Борисова//AGRO*XXI*. — 2012. — № 4. — С. 11–13.

3. *Marchoux G.* Virus des solanacées: du génome viral àla protection des cultures/G. Marchoux, P. Gognalons, K.G. Sélassié. — Paris, France. — Versailles: Quae, 2008. — 896 p.

4. *Савіна О.І.* Оцінка основної колекції на стійкість проти хвороб тютюну/О.І. Савіна//Агробіологія. — 2013. — № 10. — С. 53–57.

5. *Tian Y.P.* Genetic determinants of Potato virus Y required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene Ny in potato/Y.P.Tian, J.P. Valkonen//Mol. Plant Microbe Interact. — 2013. — V. 26, № 3. — P. 297–305.

6. *Chikh Ali M.* Whole genome sequence and characterization of a novel isolate of PVY inducing tuber necrotic ringspot in potato and leaf mosaic in tobacco/Ali M. Chikh, T. Maoka, K.T. Natsuaki// J. Phytopathology. — 2008. — V. 156. — P. 413–418.

7. *Recombinants* of PVY strains predominate among isolates from potato crop in Poland/Y. Zhimin, M. Chrzanowska, K. Michalak et al.//J. of Plant Protection Research. — 2012. — V. 52. — P. 214–219.

8. *Rapid* and simple method for purification of nucleic acids/R. Boom, C.J. Sol, M.M. Salimans et al.// J. Clin. Microbiol. — 1990. — V. 28. — P. 495–503.

9. *Розробка* діагностичних тест-систем на виявлення вірусів картопляної групи методом полімеразної ланцюгової реакції/М.Д. Мельничук, І.О. Антіпов, В.Г. Спірідонов, С.Д. Мельничук//Аграрна наука і освіта. — 2005. — Т. 6, № 1–2. — С. 5–8.

10. *Вірусні* інфекції картоплі та їх перебіг за умов модельованої мікрогравітації/Л.Т. Міщенко, В.П. Поліщук, О.П. Таран, О.І. Гордейчик. — К.: Фітосоціоцентр, 2011 — 144 с.

11. *Gugerli P.* Potato viruses/P. Gugerli//H.U. Bergmeyer, editor. Methods of enzymatic analysis. — V. XI. Antigens and antibodies 2. — VCH Verlagsgesellscaft mBH, Germany. — 1986. — P. 430–446.

12. *Салига Ю.Т.* Електронна мікроскопія біологічних об'єктів/Ю.Т. Салига, В.В. Снітинський. — Львів: Світ, 1999. — 152 с.

13. *Characterization* of potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^{N} isolates in infected Nicotiana tabacum cv. Xanthi/M. Tribodet, L. Glais, C. Kerlan, E. Jacquo// J. Gen Virol. — 2005. — V. 86. — P. 2101–2105.

14. *Шевченко О.П.* Розповсюдження та діагностика некротичних штамів Y-вірусу картоплі на Поліссі України/О.П. Шевченко//Вісн. ХНАУ. — 2006. — № 5. — С. 110–115.

15. *Nie X.* Host recovery and reduced virus level in the upper leaves after Potato virus Y infection occur in tobacco and tomato but not in potato plants/X. Nie, T. Molen//Viruses, 2015. — 7(2). — P. 680–698.

16. *Nicaise V.* Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges/V. Nicaise//Front Plant Sci. — 2014. — V. 5. — P. 660–714.

Надійшла 28.04.2017.