

ПИРАМИДИЗИРАНЕ НА УСТОЙЧИВОСТТА КЪМ КРАСТАВИЧНОМОЗАИЧНИЯ ВИРУС И ТОБАМОВИРУСИ В ЛИНИЯ ПИПЕР

Бистра Михайлова, Елисавета Стоименова

*Институт по физиология на растенията и генетика, БАН, ул. "Академик Г. Бончев" № 21,
1113 София, България
bistrasm@abv.bg*

PYRAMIDING OF CUCUMBER MOSAIC VIRUS AND TOBAMOVIRUS RESISTANCES IN A PEPPER GENOTYPE

Bistra Mihailova, Elisaveta Stoimenova

*Institute of Plant Physiology and Genetics, BAS, Acad.G.Bonchev str., 21, 1113 Sofia, Bulgaria.
bistrasm@abv.bg*

ABSTRACT

We obtained line L57 after testing and selection for CMV resistance by numerous local (Bulgarian) pepper accessions. This CMV resistance is controlled by an incompletely dominant gene. The efficiency of that resistance in the heterozygous plants is lower than that in homozygous one therefore it depends on the "gene dosage". We found that one dominant gene mediated resistance to tobamovirus strains of pathotypes P0, P1 and P1.2 in cv. Novaris.

After crossing line L57 and cv. Novaris and selection by complex CMV and PaMMoV (pathotype P1.2) resistance we created line L64. New developed sweet pepper line is "Black Kapiya" type and it is resistant to CMV, Tobacco mosaic virus (TMV), Tomato mosaic virus (ToMV), Paprika mild mottle virus (PaMMV) and Pepper mild mottle virus (PMMoV) pathotype P1.2. Its fruits are dark green in technical and deep red in botanical maturity and possess good savour and nutritional quality.

Key words: *complex disease resistance, Capsicum annuum L., Cucumber mosaic virus, Pepper mild mottle virus, Paprika mild mottle virus*

Увод

Краставичномозаичния вирус (cucumber mosaic virus - CMV) и тобамовирусите са причинители на икономически най-важните вирусни болести при пипера в България. В страната са установени tobacco mosaic virus (TMV), tomato mosaic virus (ToMV), paprika mild mottle virus (PaMMV) и pepper mild mottle virus (PMMoV) pathotype P1.2 (Bogatzevska et al, 2007). Устойчивостта при пипера към тобамовируси се определя от алелни гени (L1-L4) на локуса L, номерирани съгласно нарастващата им ефективност (Daskalov & Poulos, 1994). Съответно, TMV и ToMV от патотип P0 и заразяват само чувствителни сортове (L+), докато щамовете от PaMMV - патотип P1 и PMMoV от P1.2 и P1.2.3 преодоляват устойчивостта на гените L1, L2 и L3 съответно.

При пипера са установени множество източници на устойчивост към CMV като при повечето от тях, устойчивостта е частична и се контролира от няколко гена. Този тип устойчивост е резултат от рестрикция на инсталацията на вируса в клетката и подтискане на размножаването му. По-късно са идентифицирани източници, при които е възпрепятстван транспортът на дълги разстояния. Наследяването на този тип устойчивост се описва като рецесивен или частично доминантен тип, контролиран полигенно или от един рецесивен ген. Тези различия се обясняват с използване в експериментите на различни щамове на CMV, методите на заразяване и условията на отглеждане на растенията Zhang et al., (2011).

Цел на настоящето изследване е създаване на линия пипер, устойчива на CMV и разпространените в страната по тази култура тобамовируси.

Материал и методи.

Използвани са изолирания от Български пипер щам CMV-PB и Холандските щамове RP2 и RP3 на РММoV (Tobias et al. 1982). Растенията са заразени чрез механично натриване с инокулум на съответния вирус на листната петура, която е напудрена с карборунд 400-700 mesh. Инокулумите на РММoV съдържат 5 µg/ml пречистен препарат на съответния щам. CMV инокулумът се приготвя от лиофилизирани листа на заразен със CMV-PB тютюн, които се хомогенизират в 0.01M K-Na фосфатен буфер рН 7.0, с добавени 0.01% Na₂SO₃ и 0.01% аскорбинова киселина в разреждане 1:5 (w/v).

Изкуственото заразяване на пиперовия разсад започва във фаза 4-ти - 5-ти лист. За установяване на начина на наследяване на устойчивостта първи и втори лист се заразяват с CMV-PB или RP2 и симптомите се отчетат след 7, 14, 28 и 40 дни. За пирамидизиране на устойчивостта към двата вируса се заразяват първи и втори лист с RP2 и след 7 дни се отчитат симптомите по инокулираните листа. Растенията с локални некрози се заразяват двукратно със CMV-PB с интервал от 7 дни, като съответно се инокулират 3-ти и 4-ти лист. Системните симптоми се отчитат 28 дни след последното инокулиране и здравите растения се разсаждат и цветовете се самоопрашват.

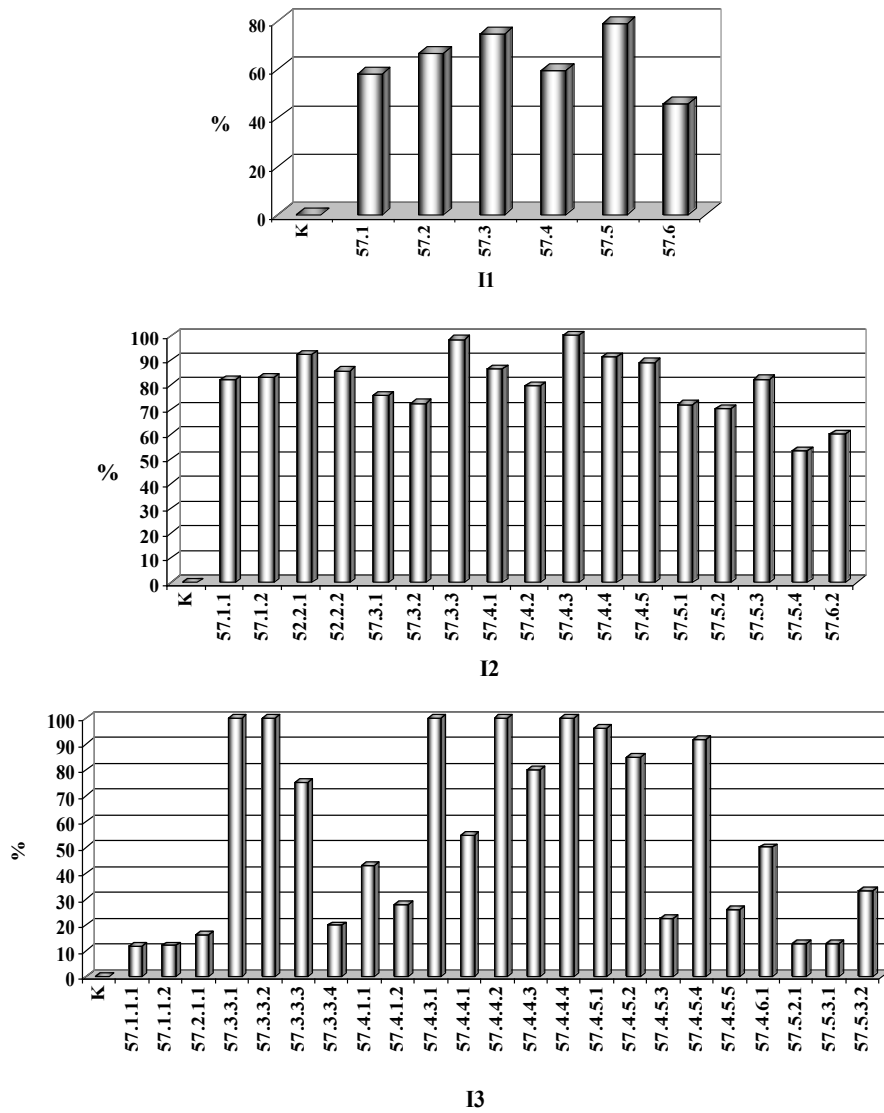
Резултати и обсъждане

Обследвайки пипер, заразен в много висока степен (над 90%) от CMV събрахме плодове от видимо здрави растения. Събраните 78 проби от семена, всяка потомство на различно растение, бяха тествани за наличие на устойчивост към CMV. Потомствата на 88.5% от растенията са чувствителни на вируса, в 8 бр. имаше отделни здрави растения и само в №57 установихме 26.4% устойчиви растения.

При отбора в №57 здравите растения в самоопрашеното I1 потомство са от 45.5% до 78.6%, а при I2 от 62% до 100%, т.е наблюдава се общо повишаване на процента здрави растения при всички тествани потомства (Фиг. 1). Високите температури непосредствено след заразяването със CMV намалиха броя на здравите растения при част от I3 потомствата, но всички растения на 5 потомства остават здрави до края на вегетацията. През следващите две години е проследена устойчивостта към CMV в поколенията на тези потомства, където здравите растения са 100% (57.3.3.1; 57.4.3.1; 57.4.4.2 и 57.4.4.4). От самоопрашени растения на 4 бр. I5 потомства са събрани семена, които са получили името линия L57.

С напредване на отбора по устойчивост се установи, че инокулираните листа пожълтяват сравнително бързо и падат до 14-я ден след заразяването. В годините, когато след заразяването дневна температура е по-висока от 30⁰C, върху натритите листа се формират жълти петна и по-рядко концентрично разположени жълти пръстени. Тези листа много бързо пожълтяват и падат, а растенията остават видимо здрави. Появата, видът и размерите на петната зависят от температурата, като при по-висока температура се образуват по-ярки и по-големи петна. Редуването на дни с висока и ниска температура определя развитието на пръстеновидни петна.

Тъй като L57 е чувствителна на тобамовируси осъществихме хибридизация със сорт Novaris устойчив на тези вируси от патотип P1.2, за да пирамидизираме устойчивостта към CMV и тобамовируси. В F2 поколение проведохме два вида изследвания: 1) за да установим начина на наследяване на устойчивостта към CMV в линия L57 и тази към тобамовируси в сорт Novaris и 2) да пирамидизираме устойчивостта към тези вируси в един генотип.



Фиг.1 Отбор по устойчивост към CMV в три поколения на самоопрашени потомства на № 57 от местни форми пипер

Табл.1 Наследяване устойчивостта към PMMoV и CMV в L57 и Novares.

Родители F1 и F2	брой растения		R:S*	χ^2	P	брой растения		R:S	χ^2	P
	R	S				R	S			
	PMMoV – RP2					CMV – PB				
L57	0	25	0:1			22	0	1:0		
Novares	25	0	1:0			0	24	0:1		
F1	20	0	1:0			14	26	1:0		
F2	94	26	3:1	0.71	< 0.1	72	48	3:1	14.4	> 0.1

* - очаквано съотношение, R – устойчиви и S – чувствителни растения

Установихме, че наследяването на устойчивостта към PMMoV се контролира от един доминантен ген (Табл.1). Растенията са чувствителни на PMMoV щамове от патотип P1.2.3, но са устойчиви на щамове от патотип P1.2, от което следва, че притежават най-вероятно L3 гена за устойчивост към тобамовируси

Устойчивостта към CMV се наследява непълно доминантно, тъй като в хетерозиготното F1 поколение се наблюдават болни и здрави растения. В чувствителни на вируса растения от сорт Novaris първите симптоми на хлороза по младите листа се появяват 10-12 дни след заразяването и една седмица по-късно има ясно изразено изоставане в развитието, водещо до вджуджаване. При F1 растенията хлорозата се появява най-рано 28 дни след инокулирането, а изоставане в развитието се установява значително по-късно и липсва вджуджаване. В F2 поколението отново има здрави и болни растения, като техният брой не отговаря на очакваното разпадане 3:1 за наличие на 1 доминантен ген. Обаче, хомозиготните по чувствителност на CMV растения могат да бъдат идентифицирани, тъй като симптомите на заболяването се появяват рано и са много тежки. Хетерозиготните растения проявяват много по-меки симптоми, а и броят на здравите растения е по-висок от очаквания, т.е. отново не всички хетерозиготни растения заболяват. В този случай отчетливо се наблюдава ефектът от дозата на гена. Несъмнено при хетерозиготните растения праговата концентрацията на вируса в инокулума, когато той преодолява устойчивостта е по-ниска. Установено е, че експресията на устойчивостта към L57 зависи от концентрацията на вируса в инокулума и броя на заразяванията (Marinova & Stoimenova 2005; Stoimenova et al. 2005).

Идентифицирането на растенията, притежаващи устойчивост към CMV и РММoV започва в F2, като те се заразяват първо с РММoV (Фиг.2). Растенията, при които по инокулираните листа се образуват локални некрози се заразяват с CMV. Цветовете на здравите растения се самоопрашват и семената се събират индивидуално за всяко растение. Получените F3 поколения се заразяват с РММoV, а тези с локални некрози и със CMV. Събират се семена само от растенията, принадлежащи към поколения, неразпадащи по устойчивост към двата вируса. Получените F4 поколения се тестват отново по описания начин за проверка на консолидацията на растенията по двата признака. Линия L64 е получена след отбор по стопански качества от F7 поколения, които в F4, F5 и F6 не са разпадали по комплексна устойчивост на вирусите.

Изводи

Устойчивостта към CMV в линия L57 се контролира от един ген, като се наследява непълно доминантно, особено в хетерозиготно състояние, т. е. ефективността зависи от дозата на гена. Устойчивостта към тобамовируси в сорт Novaris се контролира от един доминантен ген, най-вероятно от алелния ген L3. Създадена е нова линия пипер L64, в която е пирамидизирана устойчивостта към CMV от линия L57 и тази към тобамовируси от сорт Novaris

L64 е линия пипер тип черна капия, с тъмнозелени плодове, които при узряване придобиват наситено червен цвят и имат много добри вкусови качества. Тя е устойчива на CMV, TMV, ToMV, PaMMV и щамове на РММoV от патотип P1.2.

Благодарности: Авторите благодарят на Държавния Фонд за Научни Изследвания за финансовата подкрепа по договори ДФНИ-Б-02/4 и СС-1510/05.

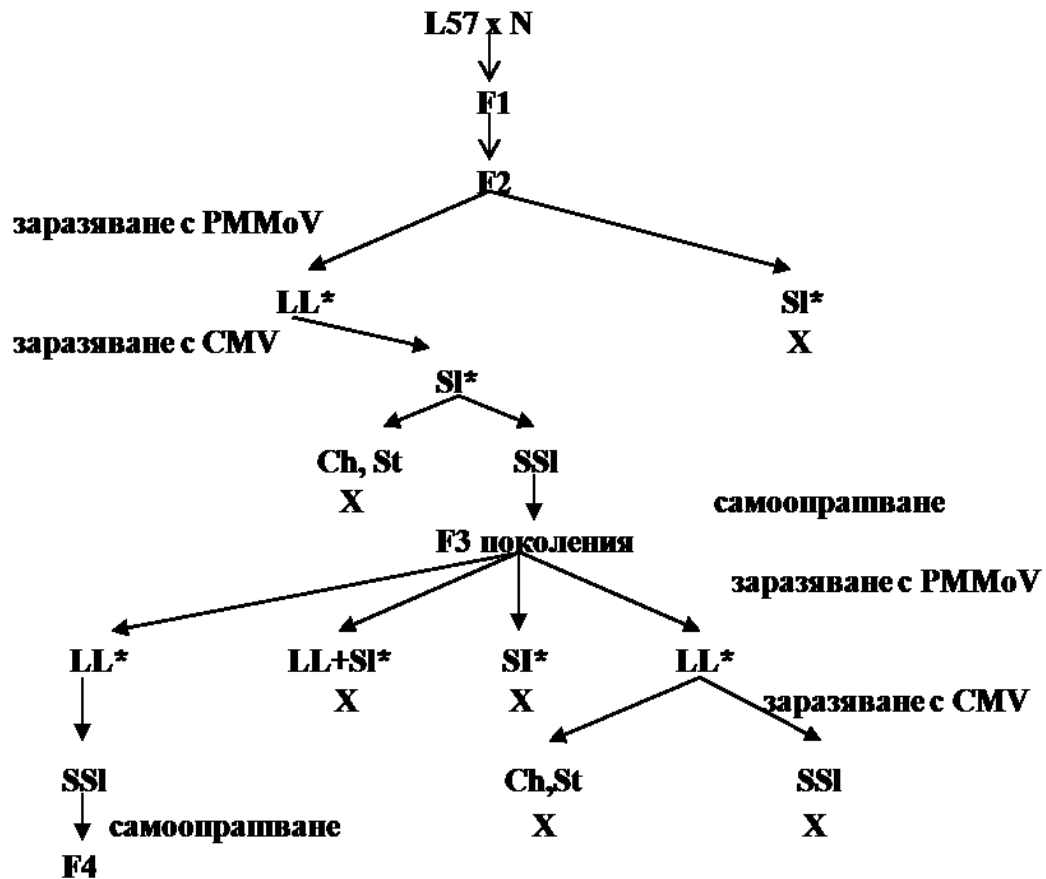
Литература:

1. Bogatzevska, N., E. Stoimenova, S. Mitrev, 2007. Bacterial and virus diseases spread in Bulgaria and Macedonia on field and greenhouse pepper, *Plant Protection*, 18, 17-21.
2. Daskalov, S., J. M. Poulos, 1994. Updated capsicum gene list, *Capsicum and Eggplant Newsletter*, 13, 15-26.
3. Marinova, G., E. Stoimenova, 2005. Influence of the inoculation number and plant stage on the expression of cucumovirus resistance in pepper lines, *Annuaire l'Universite Sofia "St.Kliment Ohridski"*, 96(4), 129-137.

4. Tobias, A., Th. B. Rast, D. Z. Maat, 1982. Tobamoviruses of pepper, eggplant and tobacco: comparative host reactions and serological relationships, *Neth. J. Pl. Path.*, 88, 257-268.

5. Stoimenova, E., G. Marinova, I. Garcia-Luque, 2005. Influence of virus concentration on expression of cucumber mosaic virus resistance in pepper, *Biotechnology and biotechnological eq.*, 19 (2), 36-41.

6. Zhang, D., X.Tan, P. Willingmann, G. Adam, C. Heinze, 2011. Problems encountered with the selection of Cucumber mosaic virus (CMV) isolates for resistance breeding programs, *J. Phytopathol.*, 159, 621-629.



Фиг. 2. Наследяване на устойчивостта към РаММV и CMV в кръстоска между L57 x Novaris (N).

* - симптоми по инокулираните листа, LL – (local lesion) локални некрози, SI – (symptomless inoculated leaf) безсимптомни инокулирани листа, SSI - (systemic symptomless (healthy) plant) безсимптомни (здрави) растения, Ch – (chlorosis) хлороза, St – (stunting) подтиснато развитие, MGM – (mild green mosaic) мека зелена мозайка, X – (stop resistant breeding) прекратен отбор по устойчивост.