

ГЕНИ ЗА УСТОЙЧИВОСТ КЪМ ТОБАМОВИРУСИ В ЛИНИИ ПИПЕР

Бистра Михайлова, Елисавета Стоименова

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

bistrasm@abv.bg

RESISTANCE GENES TO TOBAMOVIRUSES AND CUCUMBER MOSAIC VIRUS IN PEPPER LINES

Bistra Mihailova, Elisaveta Stoimenova

Institute of Plant Physiology and Genetics, BAS, Acad.G.Bonchev str., 21, 1113 Sofia, Bulgaria.

bistrasm@abv.bg

ABSTRACT

Sweet pepper line L114 possess a complex resistance to Cucumber mosaic virus (CMV), Tobacco and Tomato mosaic viruses (TMV and ToMV) and the resistant genes to these viruses are very closely linked. On the other hand Hungarian cultivar Novaris is resistant to TMV, ToMV, Paprika mild mosaic virus (PaMMV) and Pepper mild mosaic virus (PMMoV of pathotype P1.2). Based on the known that several allelic genes confer resistance to tobamoviruses we supposed that L113 has allelic gene L1, and Novaris - allelic gene L3.

It is demonstrated that CMV resistance in line L114 is controlled by one dominant gene and ToMV resistance is conferred by one dominant gene too. After crossing of line L113 and cultivar Novaris we proved complex resistance to CMV and RMMoV R1.2 in heterozygous plants only. All homozygous plants reproduce one of the two parental genotypes. Therefore, the genes for tobamovirus resistances, originating from both pepper genotypes are allele genes as not inherited as independent genes. The allelic genes L1 and L3 confer the tobamovirus resistance in line L114 and cultivar Novaris respectively. It is known that L1 is mapped to chromosome 11 and since the line L113 it is closely linked to the gene for CMV resistance we can conclude that the dominant gene for resistance to CMV is located in the same chromosome.

Key words: *complex disease resistance, Capsicum annuum L., Cucumber mosaic virus, L1 and L3 genes for tobamovirus resistance*

Увод

Устойчивостта при пипера към тобамовируси се определя от алелни гени (L1-L4) на локуса L, номерирани съгласно нарастващата им ефективност (Daskalov & Poulos, 1994). Съответно, tobacco mosaic virus (TMV) и tomato mosaic virus (ToMV) са от патотип P0 и заразяват само чувствителни сортове (L+), докато щамовете от paprika mild mottle virus (PaMMV - P1) и pepper mild mottle virus (PMMoV - P1.2 и P1.2.3) преодоляват устойчивостта на гените L1, L2 и L3 съответно.

Линия L114 е получена след продължителен отбор по устойчивост към CMV. При нейното тестиране с тобамовируси се доказва, че е устойчива на ToMV и TMV, но е чувствителна на PaMMV и PMMoV. Нещо повече линията е консолидирана по този признак (Stoimenova et al., 2006), което показва, че най-вероятно гените за устойчивост към двата тобамовируса и CMV се наследяват като скачени гени. След проведен скрининг за устойчивост сред голям брой сортове, линии и произходи от род *Capsicum* установихме, че сорт Novaris е устойчив на TMV, ToMV, PaMMV и PMMoV P1.2, но се заразява системно от PMMoV P1.2.3. Тези резултати ни дават основание да предположим, че L114 притежава алелния ген L1, а Novaris алелния ген L3.

Цел на изследването е да се установи дали нашето предположение, че устойчивостта към тобамовируси в L114 и сорт Novaris се контролира от алелни гени е вярна и да се направи опит за пирамидизиране на устойчивостта към CMV, TMV и ToMV с тази към PaMMV и PMMoV P1.2.

Материал и методи.

Използвани са изолираните от Български пипер шамове на следните вируси: CMV-PB, ToMV щам GM-0 (Stoimenova, 1995) и PMMoV Холандските шамове RP2 и RP3 на PMMoV (Tobias et al. 1982). Линия L114, създадена в Института по физиология на растенията и генетика, БАН, София (Stoimenova et al., 2006) и Унгарският сорт Novaris са използвани за хибридизация. Мъжкостерилната линия Златен медал ms-8 е включена в хибридизационна схема за доказване начина на наследяване на устойчивостта към CMV и ToMV в линия L114

Растенията са заразени чрез механично натриване на инокулум на съответния вирус в листната петура, която е напудрена с карборунд 400-700 меш. Инокулумите на тобамовирусите съдържат 5 µg/ml пречистен препарат на съответния щам. CMV инокулумът се приготвя от лиофилизирани листа на заразен с CMV-PB тютюн, които се хомогенизират в 0.01M K-Na фосфатен буфер с добавени 0.01% Na₂SO₃ and 0.01% аскорбинова киселина в разреждане 1:5 (w/v). Изкуственото заразяване на пиперовия разсад започва във фаза 5-ти - 6-ти лист. Първи и втори лист се инокулират с интервал от 5 дни с ToMV и PaMMV съответно, след още 5 дни се натриват с CMV 5-ти и 6-ти лист. Симптомите по заразените листа се отчитат 5 дни след заразяването, а системните симптоми 21 дена след последното инокулиране.

Резултати и обсъждане

Гените за устойчивост, контролиращи много близко родствени генотипове на патогена, т.е. неговите патотипове, като правило са групирани в клъстери и са тясно свързани (скачени). Пирамидизирането на гени за устойчивост към различни патотипове в един генотип е трудно, тъй като те са разположени близко, намират се в „repulsion” фаза на свързване и честотата на рекомбинация е изключително ниска. Тъй като устойчивостта към тобамовируси в линия L114 (от патотип P0) и сорт Novaris (от патотип P0, P1 и P1.2) се различава по обхвата по устойчивост към близкородствени патотипове на вирусите то хибридизацията на двата генотипа и при наличие на скачена устойчивост към CMV и тобамовируси в L114 ще ни позволи да докажем категорично дали гените за устойчивост към тобамовируси в двата пиперови генотипа са алелни или се наследяват независимо.

За целта първо е необходимо да установим начина на наследяване на устойчивостта към ToMV и CMV в линия пипер L114. Вече беше доказано, че устойчивостта към тобамовируси от патотип P1.2 в сорт Novaris се контролира от един доминантен ген (Михайлова и Стоименова под печат).

Линия L114 реагира със свръхчувствителна реакция (HR) след заразяване с CMV, ToMV и TMV, като по инокулираните листа се развиват локални некрози. За установяване наследяването на устойчивостта към посочените вируси в линия L114 (баща) я кръстосахме с чувствителната на тези вируси мъжкостерилна линия Златен медал ms-8 (майка). Тъй като вече, беше доказано, че L114 е устойчива на едновременно на шамове от патотип P0 на TMV и ToMV то в експеримента използвахме само щам на ToMV. Резултатите представени на Табл.1 показват, че устойчивостта към двата тобамовируса се контролира от един доминантен ген.

След заразяване със CMV на хетерозиготното F1 поколение, всички растения реагират с HR и остават здрави до края на опита, но при отделни растения се наблюдават системни некротични ивици по стъблото. В F2 поколението има здрави, болни и растения със системна некротизация, като общият брой здрави и растения с системни некротични симптоми към

боя на болните отговаря на очакваното разпадане 3:1 за наличие на 1 доминантен ген. Следователно, устойчивостта към CMV в линия L114 се контролира от един доминантен ген, като експресията му зависи от количеството на вируса в инокулума, боя на заразяванията и други фактори (Marinova & Stoimenova, 2005; Stoimenova et al. 2005).

Табл.1 Наследяване устойчивостта към ToMV и CMV в линия пипер L114

Родители F1 и F2	брой растения		R:S*	χ^2	P	брой растения		R:S	χ^2	P
	R	S				R	S			
	ToMV GM-0			CMV – PB						
Зл.медал ms-8	0	25	1:0			0	25	0:1		
L114	25	0	0:1			24	0	1:0		
F1	20	0	1:0			21(3)	0	1:0		
F2	94	26	3:1	0.71	< 0.1	71(7)	27	3:1	0.4	< 0.1

* - очаквано съотношение, ** - в скоби е показан броят на растенията със системни некротични симптоми, R – устойчиви и S – чувствителни растения $P_{0.1} \leq 2.71$

Устойчивите на ToMV 94 бр. растения (Табл.1), след инокулиране със CMV развиват HR, от тях 5 броя са имали системни некротични симптоми, а останалите 89 са останали здрави (данните не са представени в Табл. 1). Всичките 71 растения (Табл.1), устойчиви на CMV са останали здрави след заразяване с ToMV. Следователно, растенията, устойчиви на единия от двата вируса са устойчиви и на втория, т.е потвърдено е наблюдението, че гените за устойчивост при двата вируса се наследяват като скачени гени. Този факт ни дава възможност да проверим хипотезата, че доминантният ген, кодиращ устойчивост към тобамовируси от патотип P0 в L114 и доминантният ген, контролиращ устойчивост на тобамовируси от патотип P0, P1 и P1.2 в сорт Novaris (Михайлова и Стоименова, под печат) са алелни гени. Ако тези гени не са алелни, то те би трябвало да се наследяват независимо и след кръстосването на двата генотипа пипер, в F2 трябва да се получат значително количество растения с пирамидизирана устойчивост към CMV и PMMoV патотип P1.2, поколението на които да не разпада по устойчивост към двата вируса. Ако тези гени за устойчивост към тобамовируси са алелни, то благодарения на факта, че устойчивостта към CMV и ToMV в линия L114 се наследява като скачена, няма да се получат растения, хомозиготни по устойчивост към CMV и PMMoV патотип P1.2.

Осъществихме хибридизация между L114 (майчин родител) и сорт Novaris (бащин родител), след което получихме самоопрашени F1, F2, F3 и F4 поколения. За по-лесно възприемане на текста устойчивостта към тобамовируси в L114 е означена с L1, а тази в сорт Novaris с L3. Заразяването с PaMMV и CMV, и появата на съответните симптоми в F2 и F3 поколения е показано на Фиг.1. Всички F2 пиперови растения след заразяване с ToMV реагират с HR, което показва, че притежават устойчивост от единия и/или другия родител (не е показано на Фигурата). Заразени са 160 F2 растения с PMMoV патотип P1.2 като 117 растения реагират с HR и следователно са устойчиви на вируса.

Инокулираните листа на 43 растения остават безсимптомни, а по младите листа се появява мека зелена мозайка. Тези растения са чувствителни на PMMoV, но са устойчиви на ToMV, т.е. в тях липсва L3 ген, но притежават L1 ген. Следователно, по отношение на устойчивостта към PaMMV в F2 поколението се наблюдава очакваното разпадане 3:1 устойчиви към чувствителни растения. Групата от 43 растения е инокулирана с CMV, като всички реагират с HR и по-късно не развиват симптоми, характерни за този вирус (Фиг.1), т.е. тези растения са устойчиви на CMV и чувствителни на PaMMV (мека зелена мозайка). Направена е проверка дали растенията са хомозиготни по отношение на устойчивостта към

вирусите. Установено е, че заразени последователно с трите вируса индивидуални F3 потомства на 10 от тези растения са устойчиви на ToMV (HR) и CMV (HR) и чувствителни на РММoV, като не разпадат по посочените признаци (тестирането не е показано на фиг.1). В заключение групата от 43 растения притежава устойчивост към вируси, идентична с тази на родителската линия L114.

Устойчивите на РаММV 117 растения реагират различно на заразяване със CMV. От тях около 1/3 (39 бр.) са чувствителни на вируса, като развиват типичните симптоми – хлороза и издребняване на младите (системни) листа и изоставяне в развитието (Фиг.1). Хомозиготното наследяване на устойчивостта към РаММV и чувствителност към CMV е доказано в F3 потомството (тестирането не е показано на фиг.1). Следователно, устойчивостта на групата от 39 растения е еднаква с тази на бащиния родител сорт Novaris.

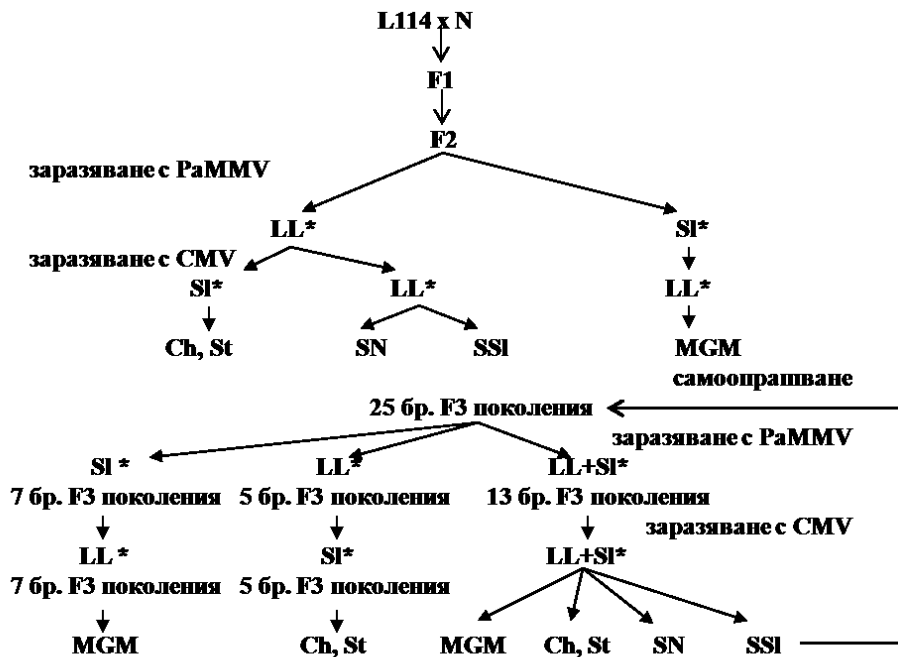
По инокулираните със CMV листа на 78 растения (около 2/3 от устойчивите на РаММV) се развиват локални некрози след което на малка част от растенията се появява системна некротизация и някои от тях загиват. С висока степен на увереност можем да твърдим, че тези растения са хетерозиготни по устойчивост към CMV, тъй като е установено, че хетерозиготните L114 растения могат да развият системна некротизация (Stoimenova et al., 2006). До края на опита остават здрави 32 растения, които са устойчиви на CMV и РаММV, т.е. при тях имаме пирамидизиране на устойчивост към CMV и тобамовируси от двата родителя. Остава открит въпросът дали тези растения са хомозиготни по устойчивост към всички вируси. Проверката е осъществена като от здравите растения получихме 25 индивидуални F3 потомства, които бяха подложени на същата схема на заразяване като тази на F2 (Фиг.1). В 7 потомства всички растения са чувствителни на РаММV и устойчиви на CMV и ToMV, т.е. няма разпадане по тези признаци (Фиг.1). Липсва разпадане по чувствителност към CMV и устойчивост към ToMV и РаММV в други 5 потомства. Заедно тези 12 потомства не разпадат по устойчивост към вирусите, идентични са по тези показатели на L114 и Novaris съответно и представляват около 50% от тестираните поколения.

Растенията от 13-те F3 потомства показват разпадане по устойчивост първо към РММoV, а след това и към CMV, като част от растенията реагират с HR, а на друга част по инокулираните листа липсват некрози. Растенията, които реагират на двата вируса с HR остават здрави до края на опита, а по две от тях се развива системна некротизация. Останалите растения имат мека мозайка, характерна за РММoV или симптоми, типични за CMV. От здравите растения са получени семена и тестирането на техните потомства в F4 показва същото разпадане по устойчивост към вирусите като това в F3. Не установихме нито едно потомство, в което всички растения да са здрави, т.е. да притежават хомозиготна устойчивост към CMV и РаММV в един геном.

Заключение

Невъзможността да се пирамидизира устойчивостта към CMV, която е скачена с тази към тобамовируси от патотип P0 и устойчивостта към щамове от патотип P1.2 показва, че гените, контролиращи двата патотипа устойчивост при тобамовирусите са алелни. Резултатите от нашето изследване ни дават основание да заключим, че линия L114 притежава ген L1, а сорт Novaris - ген L3. Тъй като алелната серия гени L е картирана в 11 хромозома следва, че доминантният ген, определящ устойчивост към CMV е разположен в същата 11 хромозома в тясна близост с ген L1.

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



Фиг. 1 Наследяване на устойчивостта към PMMoV патотип P1.2 и CMV в кръстоска между L114 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, SN – (systemic necrosis) системни некротични симптоми

Литература:

1. Михайлова, Б., Е. Стоименова, Пирамидизиране на устойчивостта към краставичномозайчния вирус и тобамовируси в линия пипер, Наука и технологии, (под печат)
2. 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.
3. Daskalov, S., J. M. Poulos, 1994. Updated capsicum gene list, Capsicum and Eggplant Newsletter, 13, 15-26.
4. 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.
5. 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.
6. Stoimenova E. Investigation on the strain variability of Tobamovirus and Cucumovirus groups isolated in Bulgaria, J. Culture collections, T.1, 1995. C. 46-52.
7. 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.