

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГОРОШКА ОДНОПАРНОГО**

На горошке однопарном *Vicia unijuga* A.Br. выявлен новый вирусный изолят с нитевидными частицами размерами 1000-1200 x 10-12 нм. Точка термической инактивации 55 °С. Предельное разведение сока –  $10^5$ - $10^6$ . При комнатной температуре вирус сохранял инфекционность в соке бобов менее суток. Передается тлями и семенами гороха, фасоли и бобов. Может поражать бобовые, пасленовые, маревые.

Выход вируса – 20-30 мг на 100 г листьев. Соотношение поглощения  $E_{260}/E_{280}$  соответствовало 1,4-1,5. Молекулярная масса капсидного белка вируса составила 34 кДа. Вирус обладает высокой иммуногенностью (титр в ИФА 1:25600). Предположительно идентифицирован как представитель семейства *Closteroviridae*.

Ключевые слова: бобовые, фитовирус, *Closteroviridae*, выделение, очистка, антиген.

На Дальнем Востоке уже более 30 лет проводится мониторинг вирусных болезней дикорастущих видов, которые могут быть резервуаром инфекции для культивируемых растений. Идентификация возбудителей этих заболеваний, установление происхождения и путей их распространения необходимы для разработки мероприятий по защите природных биоценозов.

На горошке однопарном в Амурской области было выявлено заболевание с симптомами мозаики (рис. 1). Патоген удалось передать на ряд индикаторов и показать, что симптомы заболеваний тест-растений отличаются от описанных ранее. Изучение биологических, физико-химических и антигенных свойств этого предположительно нового вируса и является основой этой работы.



Рис. 1. Симптомы заболевания горошка однопарного *Vicia unijuga* A.Br.

**Материалы и методы.** Изучаемым вирусом заражали семена культивируемых и дикорастущих видов растений, преимущественно из семейств *Fabaceae* Lindl., *Solanaceae* Juss., *Amaranthaceae* Juss., *Chenopodiaceae* Vent. В качестве тест-растений для выявления возможного бессимптомного заражения использовали семена дурмана вонючего *Datura stramonium* L. и мари киноа *Chenopodium quinoa* Will. С инфицированных растений собирали семена и высевали для изучения возможности передачи вируса вертикально. Тестирование семян также проводили на дурмане и мари киноа. Возможность передачи вируса тлями проводили следующим образом: тлей *Myzus persicae* Sulz. и *Aphis gossypii* Glov. выдерживали 3 часа голодными и подсаживали на больные растения бобов и дурмана на 3 часа. Затем инфицированных тлей подсаживали по 10 экземпляров разного возраста на здоровые растения бобов и гороха. Через 3-5 часов тлей уничтожали. Тестирование заражения проводили на дурмане и мари киноа.

Физико-химические свойства вирионов: точку термической инактивации (ТТИ), предельное разведение сока (ПРС) и период сохранения инфекционности *in vitro* (ПСИ) – определяли стандартными методами в соке инфицированного дурмана [1].

Очищенный препарат получали из сока заражённых листьев бобов, инокулированных вирусным изолятом по методике Б. Кассаниса с соавт. модифицированной нами [10].

Препараты для электронной микроскопии готовили из листьев больных растений методом погружения и из очищенных препаратов вируса методом разведения [2].

Молекулярную массу (ММ) капсидного белка определяли по относительной электрофоретической подвижности методом У. Лэммли [11].

Поликлональные кроличьи антисыворотки получали по следующей схеме иммунизации:

1 иммунизация 250 мкг антигена + полный адьювант Фрейнда (США) внутрикожно и подкожно в 9-12 точек;

2 иммунизация (через 14 дней после первой) – 200 мкг антигена + полный адьювант Фрейнда (США) внутрикожно и подкожно в 6-8 точек;

3 иммунизация (через 21 дней после второй) – 200 мкг антигена + полный адьювант Фрейнда (США) внутрикожно и подкожно в 6-8 точек;

4 иммунизация (через 21 дней после третьей) – 200 мкг антигена + полный адьювант Фрейнда (США) внутрикожно и подкожно в 6-8 точек.

Антигенные свойства изучали непрямым методом ИФА [3], методом ракетного иммуноэлектрофореза (РИЭФ), реакцией двойной диффузии в геле (РДД) [4].

**Результаты и их обсуждение.** Из инокулированных растений, относящихся к 4 семействам, выявлено 16 видов, чувствительных к вирусу (табл. 1). Отмечен высокий процент поражения инокулированных растений. Локальной некротической реакции не наблюдали ни на одном тест-растении. Все симптомы проявлялись системно. Признаки заболевания развивались медленно. Можно предположить, что скорость накопления вируса низкая. Характерными симптомами на инфицированных тест-растениях были посветление жилок, хлоротичная мозаика, карликовость и заострение верхних листьев, замедление роста, а в некоторых случаях и гибель растений от системной некротизации стебля.

Таблица 1

**Круг растений-хозяев изолята вируса из горошка однопарного**

Вид растений-хозяев	Срок появления симптомов (сут.)	Симптомы
<i>Chenopodiaceae Vent.</i>		
<i>C. quinoa Willd.</i>	7-14	Системная точечная некротизация
<i>Fabaceae Lindl.</i>		
<i>Galega officinalis L.</i>	30	Хлороз, удлинение листьев
<i>Galega orientalis L.</i>	30	Хлороз
<i>Phaseolus angularis L.</i>	20	Стягивание жилок, некротизация листьев
<i>Phaseolus coccineus L.</i>	14	Светло-зеленая крапчатость, стягивание жилок
<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	30	Мозаика, карликовость и заострение верхних листьев
<i>Pisum arvense L.</i>	7-14	Посветление жилок, мозаика
<i>Pisum sativum L.</i> cv. <i>Alaska</i> cv. <i>Wisconsin Perfection</i> cv. <i>Жегалова</i>	5 7-14 7-14	Некротизация побега Посветление жилок, мозаика Посветление жилок, мозаика
<i>Faba bona Medik.</i>	5-20	Посветление жилок, мозаика, карликовость и деформация верхних листьев, некрозы
<i>Vicia pseudorobus Fisch. et Mey.</i>	20	Мозаика
<i>Vicia unijuga A.Br.</i>	20	Мозаика
<i>Melilotus albus Desr.</i>	30	Мозаика
<i>Melilotus suaveolens Ledeb.</i>	40	Светло-зеленая крапчатость
<i>Lupinus polyphyllus L.</i>	30	Мозаика, деформация листьев
<i>Cassia occidentalis L.</i>	30	Мозаика, некротические кольца
<i>Solanaceae Juss.</i>		
<i>Petunia x hybrida Vilm.</i>	30	Стягивание жилки
<i>Datura stramonium L.</i>	7-14	Некрозы на инокулированных листьях

Отмечена 100-процентная передача вируса семенами гороха, фасоли и бобов. Была показана векторная передача вируса персиковой *Myzus persicae Sulz.* и бахчевой *Aphis gossypii*

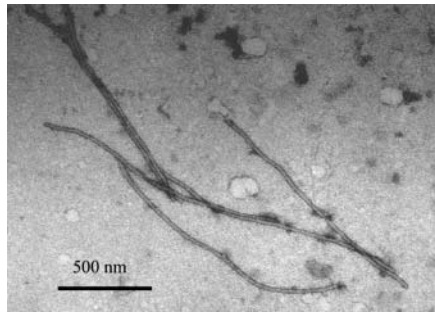
*Glov.* тлей. Типичные признаки заболевания на растениях бобов и гороха появлялись спустя 10-14 сут. Все инокулированные тлями растения были инфицированы.

Поскольку вирус легко передается тлями и семенами и поражает большое количество видов бобовых, патоген может иметь важное экономическое значение.

Вирус неустойчив к внешним воздействиям: температуре и условиям хранения.

Так, сок листьев пораженных конских бобов сохранял инфекционные свойства при температуре 50 °С, а при 55 °С терял их. При хранении при комнатной температуре вирус сохранял инфекционность в соке бобов менее суток. Под глицерином при температуре 4 °С очищенный препарат вируса сохранял инфекционность свыше 6 мес. С добавлением азидата натрия при 4 °С вирус сохранял инфекционность не более 2-х мес. Инфекционность вируса терялась при разведении сока в  $10^5$ - $10^6$  раз, то есть концентрация вируса в растении довольно высокая и вирус не имеет разделенного генома.

Исследование сока зараженных листьев бобов в электронном микроскопе показало наличие длинных изогнутых вирусных частиц нитевидной формы 1000-1200 нм длиной и 10-12 нм в диаметре (рис. 2).

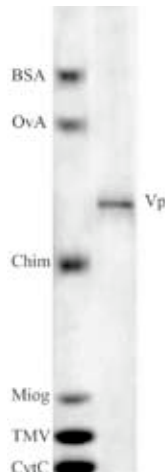


**Рис. 2.** Электронограмма вирусных частиц изолята из горошка однопарного.

При отработке способа выделения был испытан ряд методик, разработанных для выделения и очистки нитевидных вирусов из родов *Carla*-, *Poty*- и *Closterovirus* [10, 5, 6]. Наиболее оптимальной оказалась модифицированная нами методика Кассаниса с соавторами [10], разработанная для кластеровируса желтухи сахарной свёклы.

Очищенный препарат имел типичный для нуклеопротеидов спектр поглощения в ультрафиолетовом свете с минимумом 245 нм и максимумом 260 нм. Соотношение поглощения  $E_{260}/E_{280}$  соответствовало 1,4-1,5, что не типично для большинства семейств нитевидных вирусов. Выход вируса составил 20-30 мг на 100 г листьев инфицированных бобов, что в 1,5-3 раза выше, чем при использовании других методик, стабильность вирусных частиц при этом выше.

Молекулярная масса капсидного белка вируса, определённая методом электрофореза вирусного препарата в 15 % полиакриламидном геле, составила 34 кДа (рис. 3).



**Рис. 3.** Фореграмма структурного белка вирионов изолята из горошка однопарного.

Исследуемый вирусный изолят – активный иммуноген. Используемая нами схема иммунизации позволила получить поликлональные антитела с высоким титром, который составил в непрямом методе ИФА 1:25600. Применение комплекса иммунохимических методов не позволило установить родственных взаимоотношений ни с одной из таксономических групп вирусов, идентифицированных на Дальнем Востоке. Это говорит о том, что исследуемый изолят не имеет общих антигенных детерминант с представителями родов *Carla-*, *Potex-* и *Potyvirus* с нитевидными вирионами. Сравнение свойств исследуемого изолята с типовыми свойствами представителей различных таксономических групп, описанных в литературе, показало, что выявленный нами вирусный изолят, вызывающий мозаику на горошке однопарном в Амурской области, наиболее близок по своим характеристикам к роду *Closterovirus* семейства *Closteroviridae* (табл. 2).

Таблица 2

**Сравнение характеристик изучаемого изолята и различных родов вирусов с нитевидными вирионами (по данным Ван Регенмортеля с соавт.) [13].**

Характеристики	Роды вирусов				Исследуемый изолят
	<i>Potexvirus</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Closterovirus</i>	
Размер частиц	450-580	550-720	700-900	>1000	1000-1200
E260/280	1,2	1,2	1,2	1,4-1,6	1,4-1,5
Молекулярная масса белка (кДа)	20-31	23-40	28-54	22-39	34
ТТИ (°C)	55-100	50-85	45-90	40-55	55
ПСИ (сут.)	20-40	2-7	2-14	0,5-2	<1
Семенная передача	редко	редко	часто	не показано	есть
Передача тлями	отсутствует	показана	2 рода	1 род	показана

Из таблицы видно, что:

- длина вирусных частиц изучаемого изолята соответствует длине вирусов этого рода;
- препарат вируса имеет характерный для кластеровирусов нуклеопротеидный спектр поглощения, отличающийся от спектра других нитевидных вирусов;
- наблюдается высокая лабильность вирусного капсида;
- вирус передаётся тлями, что показано для одного рода из сем. *Closteroviridae*;
- данные о молекулярной массе белка не противоречат предположению о принадлежности патогена к кластеровирусам;
- не выявлено антигенного родства ни с одной таксономической группой нитевидных вирусов, что также не противоречит высказанному предположению.

В то же время, судя по литературным данным, для известных представителей *Closteroviridae* не показана семенная передача (хотя следует заметить, что биологические свойства большинства видов этого семейства изучены недостаточно).

Кроме того, в последнее время на основании молекулярно-генетических свойств выделяются новые роды вирусов (*Foveavirus*, *Trichovirus*, *Vitivirus*, *Capillovirus*, *Allexivirus*, and *Mandarinivirus*), которые включают в новое семейство *Flexiviridae* вместе с *Potexvirus* и *Carlavirus* [7]. В то же время и в известных семействах существуют отдельные представители, которых трудно включить в определенную таксономическую группу. В качестве примера можно привести схему филогенетической взаимосвязи семейства *Closteroviridae*, которое разделено на три рода, сильно отличающиеся между собой по биологическим и молекулярно-генетическим свойствам [12]. Однако часть включаемых в семейство видов не смогли отнести к этим трём родам.

Представителей сем. *Closteroviridae* ранее в Приморском крае и России не выявляли. Известно лишь, что А. Карасёв с соавторами [9] и А. Аграновский с соавт. [8] проводили исследования украинского изолята вируса желтухи свеклы из рода кластеровирусов. В России этот вирус пока не выявлен.

Таким образом, можно предположить, что исследуемый вирус является первым, выявленным в России, представителем семейства *Closteroviridae*. В то же время нельзя исключить возможность того, что это представитель сем. *Potyviridae*, не имеющий антигенного родства с идентифицированными представителями этого таксона.

Для более определенной идентификации исследуемого патогена планируется изучить особенности генома вируса для сравнения его с подобными вирусами.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГОРОШКА ОДНОПАРНОГО

### Резюме

На горошке однопарном *Vicia unijuga* A.Br. выявлен новый вирусный изолят с нитевидными частицами размерами 1000-1200 × 10-12 нм. Точка термической инактивации 55 °С. Предельное разведение сока – 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>. При комнатной температуре вирус сохранял инфекционность в соке бобов менее суток. Передается тлями и семенами гороха, фасоли и бобов. Может поражать бобовые, пасленовые, маревые.

Выход вируса – 20-30 мг на 100 г листьев. Соотношение поглощения E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> соответствовало 1,4-1,5. Молекулярная масса капсидного белка вируса составила 34 кДа. Вирус обладает высокой иммуногенностью (титр в ИФА 1:25600). Предположительно идентифицирован как представитель семейства *Closteroviridae*.

Ключевые слова: бобовые, фитовирус, *Closteroviridae*, выделение, очистка, антиген.

*N.N.Kakareka, Z.N.Kozlovskaya, Yu.G.Volkova*

Biologic-Soil Institute, Far East Division of the Russian Academy of Sciences

## CHARACTERISTIC OF UNIPOROUS PEA VIRUS

### Summary

The new virus isolated from *Vicia unijuga* A.Br. with filament particles with size 1000-1200 × 10-12 nm is revealed. A thermal inactivation point is 55 °C; dilution end point – 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>; longevity *in vitro* in broad bean sap – less than one day. It is transferred by aphids and by pea, bean and broad bean seeds. The plants of *Fabaceae*, *Solanaceae* and *Chenopodiaceae* fam. were affected by this virus isolate.

The virus yield was 40–50 mg per 100 g of leaves. The ratio of absorption E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> corresponded to 1.4-1.5. The molecular mass of a core protein of the virus was 34 kD. The virus has a high immunogenic properties – titer is 1:256000 (indirect method of ELISA). It is presumably identified as a member of *Closteroviridae*.

The paper is presented in Russian.

Key words: legumes, phytovirus, *Closteroviridae*, isolation, purification antigen.

The authors' address: *Kakareka N.N.*, Biologic Soil Institute, Far East Division of the Russian Academy of Sciences; 159 Sto Let Vladivostoku Prosp., Vladivostok, 690012, Russia

1. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир, 1978. – 429 с.
2. Развязкина Г.М. Вирусные заболевания злаков. – Новосибирск: Наука, 1975. – 291 с.
3. Буракова О.В. Иммуноферментный анализ // Практикум по иммунологии. – М.: Изд-во МГУ, 2001. – С. 69–82.
4. Воробьева Н.В. Иммунодиффузия в геле и иммуноэлектрофорез // Практикум по иммунологии. – М.: Изд-во МГУ, 2001. – С. 42–63.
5. Новиков В.К., Атабеков И.Г., Азур М.С., Яревкильг Л.В., Нурмисте Б.Х. Метод получения препарата У-вируса картофеля для приготовления диагностических антисывороток // С.-х. биол. – 1982. – 17, № 5. – С. 706–711.
6. Николаева О.В., Новиков В.К., Каграмонов В.Н., Бобкова А.Ф., Атабеков И.Г. Определение М и S вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа // С.-х.биол. – 1985. – № 2. – С. 24–28.
7. Adams M.J., Antoniw J.F., Bar-Joseph M. et al. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation // Arch. Virol. – 2004. – 149. – P. 1045–1060.
8. Agranovsky A.A., Koonin E.V., Boyko V.P. et al. Beet yellows closterovirus: complete genome structure and identification of a leader papain-like thiol protease // Virology. – 1994. – 198. – P. 311–324.
9. Karasev A.V., Agranovsky A.A., Rogov V.V. et al. Virion RNA of beet yellows closterovirus – cell-free translation and some properties // J. Gen. Virol. – 1989. – 70. – P. 241–245.
10. Kassanis B., Carpenter J.M., White R.F., Woods R.D. Purification and some properties of BYV // Virology. – 1977. – 99. – P. 95–100.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227, N 5259. – P. 680–685.
12. Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M. et al. The family *Closteroviridae* revised // Arch. Virol. – 2002. – 147, N 10. – P. 2039–2044.
13. Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. – London; San Diego: Academic Press, 2000. – P. 943–952.

Отримано 19.05.2009