

УДК 635.1/7:578.864.3

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ИЗОЛЯТА ВИРУСА ЖЕЛТОЙ МОЗАИКИ ФАСОЛИ, ОБНАРУЖЕННОГО НА РАСТЕНИЯХ ТЫКВЫ

Р.В. ГНУТОВА, В.Ф. ТОЛКАЧ

Проводили идентификацию вируса желтой мозаики фасоли (ВЖМФ), впервые обнаруженного на юге Дальнего Востока России на растениях тыквы с симптомами хлоротичной мозаики листьев. Изучали биологические, физико-химические и антигенные свойства изолята ВЖМФ.

Ключевые слова: вирус, изолят вируса, идентификация, видовое разнообразие, род, семейство тыквенных, *Cucurbitaceae*, овощные культуры.

Среди фитопатогенных вирусов наибольший экономический ущерб до сих пор причиняют те, которые поражают сельскохозяйственные растения, в частности, овощные культуры. На Дальнем Востоке в основном возделывают растения, относящиеся к семейству тыквенных (*Cucurbitaceae*) — тыква, кабачок, огурец, арбуз, патиссоны и др. и пасленовых (*Solanaceae*) — томат, перец, баклажан, картофель и др. При многолетнем мониторинге в Приморском и Хабаровском краях, а также Камчатской области нами показано, что наиболее вредоносными для пасленовых и тыквенных овощных культур являются вирус табачной и огуречной мозаики (соответственно ВТМ и ВОМ). ВТМ чаще поражает пасленовые (томат, перец и баклажан), а ВОМ — тыквенные (огурец, тыква и кабачок) овощные культуры. Следует отметить и вирус мозаики арбуза 1 (ВМА 1) — новый для России патоген, поражающий в Дальневосточном регионе главным образом растения тыквы и кабачка. ВОМ вызывает на молодых листьях, как правило, яркую хлоротичную крапчатость, а ВМА 1 — хлоротичную мозаику (1).

В последние годы в Дальневосточном регионе выявлен новый патоген тыквенных овощных растений — вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ). Мутационный процесс в популяциях ВТМ, ВОМ и ВЖМФ протекает весьма интенсивно, следствием чего является большое внутривидовое разнообразие этих вирусов. В настоящее время известно около 100 штаммов ВОМ и более 300 штаммов ВТМ. Только на юге Приморского края идентифицировано свыше десяти штаммов ВТМ и шести штаммов ВЖМФ (2).

Семейство *Cucurbitaceae* широко распространено в мире и включает 100 родов и 580 видов растений (3). Однако пищевую ценность для человека имеют только 12 видов: арбуз обыкновенный (*Citrullus vulgaris*); огурец антильский (*Cucumis angularia*) и посевной (*C. sativus*); тыква гиганская (*Cucurbita maxima*), смешанная (*C. mixta*), мускусная (*C. moschata*) и посудная (*Lagenaria sicerata*); кабачок (*C. pepo*), луффа остроробкая (*Luffa acutangula*) и цилиндрическая (*L. cylindrical*); мексиканский огурец (*Sechium edula*). Кроме того, из шести родов (*Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Luffa* и *Sechium*) только четыре — *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria* имеют важное экономическое значение как наиболее часто используемые.

В задачу нашей работы входила идентификация, а также изучение биологических, физико-химических и антигенных свойств изолята ВЖМФ, впервые выявленного на юге Дальнего Востока на тыквенных овощных культурах.

Методика. Объектом исследования служили растения тыквы с симптомами вирусного поражения, обнаруженные в Приморском крае при обследовании коллекционного участка овощных культур Октябрьского опорного пункта (Уссурийский р-н) Приморской овощной опытной станции Всероссийского НИИ овощеводства. Идентификацию вируса проводили методами биологического тестирования: изучали круг растений-хозяев и симптомы заболевания, а также возможность передачи вирусной инфекции тлями *Myzus persicae*. Определяли физические свойства вируса (точку термической инактивации — ТТИ, период сохранения инфекционности сока — ПСИ и предельное разведение инфекционного сока — ПРС). Оценивали морфологию вирионов и наличие вирусных включений в клетках инфицированных растений при использовании соответственно электронного и светового микроскопа (4). Применяли физико-химические методы получения очищенных препаратов вируса и иммунохимические методы исследования капсидных белков (5).

Результаты. Методом электронной микроскопии в исходном образце тыквы выявлены нитевидные частицы длиной 700-750 нм, характерные для вирусов рода *Potyvirus* сем. *Potyviridae* (рис. 1).

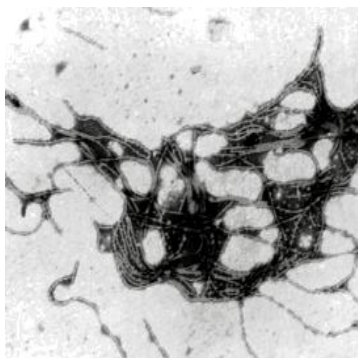


Рис. 1. Электронная микрофотография частиц вируса желтой мозаики фасоли, обнаруженного на растениях тыквы в Дальневосточном регионе ($\times 10000$).

При инокуляции растений 33 видов и сортов из семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae* вирус поражал растения только из трех семейств: *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae* и *Fabaceae* (табл.). На натертых листьях мари амброзиевой (*Chenopodium ambrosoides*) возникали локальные некрозы; у растений кабачка (*C. pepo*) сортов Черный красавец и Аэронавт вирус вызывал хлоротичную крапчатость молодых листьев, у сорта Тиволи — посветленные жилки; тыквы крупноплодной (*C. maxima*) — слабую хлоротичную крапчатость; у растений донника белого (*Melilotus albus*) и пажитника греческого (*Trigonella foenum-graecum*) отмечены хлороз жилок и деформация; фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* cvs. Golubka и Perlicka) — хлоротичная мозаика и деформация листьев; лобии (*Dolichos lablab*), донника лекарственного (*M. officinalis*), донника индийского (*M. indicus*) — хлоротичная штриховатость, донника белого (*M. albus*) — хлороз жилок и деформация листьев; у бобов конских (*Faba bona*) — зеленое окаймление главной и средней жилок с последующим хлорозом жилок (рис. 2).

Показатели ТТИ, ПРС и ПСИ исследуемого вируса составляли соответственно 70-75 °С; 10^{-4} - 10^{-5} и 5 сут. Вирус легко передавался персиковой тлей (*M. persicae*). Реакция инфекционного сока при двойной иммунодиффузии в агаре с антисывороткой против ВОМ (наиболее распространенный вирус на тыквенных овощных культурах) была отрицательной, что свидетельствует о моноинфекции в изучаемом образце.

По методу Гольдина с помощью светового микроскопа во всех клетках эпидермиса зараженных вирусом растений бобов конских выявлены типичные для вирусов рода *Potyvirus* сем. *Potyviridae* околядерные включения — X-тела, которые появляются одновременно с первичными симптомами болезни (рис. 3).

Нами был получен очищенный препарат вируса (5), для накопления которого использовали растения бобов конских. Препарат характеризовался достаточно высокой степенью очистки, что подтверждено методами электронной микроскопии, электрофорезом и спектрофотометрическими исследованиями вирусспецифических белков. Максимальный выход вируса составлял 150,3 мг/кг зеленой массы. Молекулярная масса основного белка ВЖМФ равнялась 32-34 кДа. В вирусном препарате отмечено наличие нескольких полипептидных фракций, то есть наблюдался частичный протеолиз основного белкового компонента.



Рис. 2. Системное окаймление жилок листа бобов конских (*Faba bona*), зараженных вирусом желтой мозаики фасоли, обнаруженным на растениях тыквы в Дальневосточном регионе.

К вирусу были получены поликлональные антисыворотки (крысиная и кроличья), титр которых в капельной агглютинации составлял 1:512-1:1024, а по результатам реакции двойной иммунодиффузии — 1:64-1:256. Вирус являлся умеренным иммуногеном.

При сравнении антигенных свойств у изолята и других представителей рода потивирусов установлено антигенное родство с Y-вирусом картофеля, вирусами гравировки табака и мозаики арбуза, идентифицированными ранее в Дальневосточном регионе, что свидетельствует о его принадлежности к роду потивирусов. Показано, что наряду с идентичными эпитопами капсидными белками вирус несет индивидуальные антигенные детерминанты.

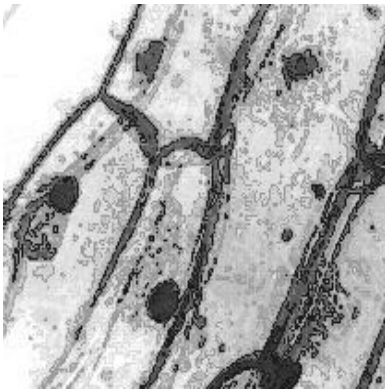


Рис. 3. Околоядерные X-тела в инфицированных вирусом желтой мозаики фасоли клетках растений бобов конских (*Faba bona*).

По данным литературы, тыквенные овощные культуры поражаются следующими специфическими вирусами: вирусом огуречной мозаики (ВОМ) — *Cucumber mosaic virus*, вирусом струящейся мозаики огурца (ВСМО) — *Cucumber squirting mosaic virus*, вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) — *Cucumber green mottle mosaic virus*, вирусом мозаики арбуза 1 и 2 (ВМА 1 и 2) — *Watermelon mosaic virus 1 и 2*, вирусом мозаики белой бривии (ВМББ) — *Bryonia white mosaic virus*, вирусом кольцевой пятнистости папайи (ВКПП) — *Papaya ringspot virus*, вирусом желтой мозаики цуккини (ВЖМЦ) — *Zucchini yellow mosaic virus*, вирусом желтой крапчатости цуккини (ВЖКЦ) — *Zucchini yellow fleck virus*, вирусом мозаики тыквы (ВМТ) — *Squash mosaic virus*, вирусом некроза огурца (ВНО) — *Cucumber necrosis virus*, вирусом пожелтения жилок огурца (ВПЖО) — *Cucumber vein yellowing virus*, вирусом некроза жилок дыни (ВНЖД) — *Muskmelon vein necrosis virus*, вирусом некротической пятнистости французской дыни (ВНПФД) — *French muskmelon necrotic spot virus*, вирусом некротической пятнистости дыни (ВНПД) — *Muskmelon necrotic spot virus*, а также неспецифическими вирусами — вирусом кольцевой пятнистости табака (ВКПТ) — *Tobacco ringspot virus*, вирусом мозаики резухи (ВМР) — *Arabis mosaic virus*, вирусом кольцевой пятнистости томата (ВКПТ) — *Tomato ringspot virus*, вирусом табачной мозаики (ВТМ) — *Tobacco mosaic virus*, вирусом желтой мозаики фасоли (ВЖМФ) — *Bean yellow mosaic virus* (6, 7) и вирусом некроза табака (ВНТ) — *Tobacco necrosis virus*.

Реакция тест-растений на заражение изолятом вируса желтой мозаики фасоли, выявленным на растениях тыквы

Семейство, вид, род растений	Поражение	
	локальное	системное
Сем. <i>Amaranthaceae</i> J.G. Agardh		
<i>Amaranthus caudatus</i>	—	—
<i>Gomphrena globosa</i>	—	—
Сем. <i>Chenopodiaceae</i> Vent.		
<i>Chenopodium album</i>	—	—
<i>Ch. ambrosoides</i>	N	
<i>Ch. quinoa</i>	—	—
<i>Ch. murale</i>	—	—
Сем. <i>Cucurbitaceae</i> Juss.		
<i>Cucurbita maxima</i>	—	CIMot
<i>C. pepo.</i> :		
Аэронавт	—	CIMot
Триволи	—	CIVe
Черный красавец	—	CIMot
<i>Cucumis sativus</i> :		
Водолей	—	—
ДВ 6	—	—
Сем. <i>Fabaceae</i> Lindl.		
<i>Dolichos lablab</i>	—	—
<i>Faba bona</i>	—	GrBdVe, CIVe
<i>Lupinus pollyphylus</i>	—	—
<i>Lens culinaris</i>	—	—
<i>Medicago sativa</i>	—	—
<i>Melilotus albus</i>	—	CIVe, Dis
<i>M. indicus</i>	—	CIStr
<i>M. officinalis</i>	—	CIMot
<i>Phaseolus vulgaris</i> :		
cvs. Golubka	—	CIM, Dis
cvs Perlicka	—	CIM, Dis
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	—	CIVe, Dis
<i>Trifolium arvense</i>	—	—
<i>Tr. alpestris</i>	—	—
<i>Tr. angustifolium</i>	—	—
<i>Tr. ochroleucum</i>	—	—
<i>Tr. pannonicum</i>	—	—
Сем. <i>Solanaceae</i> Juss.		
<i>Datura stramonium</i>	—	—
<i>Hyoscyamus alba</i>	—	—
<i>Nicotiana glutinosa</i>	—	—
<i>N. tabacum</i> :		
cvs. Samsun	—	—
Xanthi	—	—

Из перечисленных вирусов представителями рода *Potyvirus* являются ВМА, ВЖМЦ, ВКПП, ВЖМФ и ВЖКЦ. Принимая во внимание полученные нами данные, исследуемый изолят можно было отнести к одному из пяти упомянутых вирусов рода потивирусов. Однако экспериментальный круг растений-хозяев ВМА 1 ограничен только видами растений семейства *Cucurbitaceae*, а для ВМА 2 характерен довольно широкий круг экспериментально поражаемых растений, включающий представителей более чем 9 семейств, и он инфицирует около 150 видов. Эти результаты не соответствуют полученным нами данным по кругу инфицированных тест-растений, поэтому мы не можем отнести исследуемый изолят к ВМА 1 или 2.

ВЖКЦ обнаружен только в Италии и поражает исключительно растения из семейства *Cucurbitaceae*. При механическом заражении растений этим вирусом, кроме системной реакции, на инокулированных листьях обязательно присутствуют некрозы (исключение — растения горлянки *Lagenaria* sp.), то есть изучаемый изолят не имеет сходства и с ВЖКЦ.

ВЖМЦ у зараженных в естественных и экспериментальных условиях растений вызывает очень сильное поражение: карликовость, измельчение листьев с последующим некрозом, деформацией, некрозом плодов и семян и гибель растений. Восприимчивыми к этому вирусу являются растения из семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*. От других видов рода потивирусов, поражающих растения семейства *Cucurbitaceae*, ВЖМЦ отличается тем, что вызывает локальные симптомы поражения у растений гомфрены шаровидной (*Gomphrena globosa*). В нашем эксперименте подобного не наблюдалось, поэтому мы не считаем, что вирус мозаики цуккини распространен в Дальневосточном регионе.

ВКПП поражает только растения из семейств *Chenopodiaceae* и *Cucurbitaceae*. Этот вирус пока не обнаружен на территории России. Наши данные тоже свидетельствуют об отсутствии ВКПП в Дальневосточном регионе.

Хотя вирус, выявленный нами на растениях тыквы, по результатам электронной микроскопии, антигенным и физическим свойствам и способу передачи тлями отнесен к роду *Potyvirus*, важным критерием принадлежности патогена к определенному виду является симптоматика и экспериментальный круг растений-хозяев. Анализируя данные литературы и результаты наших экспериментов, мы пришли к выводу о том, что по биологическим свойствам вирус, обнаруженный на растениях тыквы, можно с уверенностью отнести к ВЖМФ. По симптоматике и кругу поражаемых растений он наиболее близок к итальянским штаммам Z 1 и Z 2, которые выявлены на растениях кабачка и поражают растения огурца (*Cucumis sativus*), кабачка (*Cucurbita pepo*), гороха посевного (*Pisum sativum*), мари амарантоцветной и квиноа (*Ch. amaranticolor* и *Ch. quinoa*), а также фасоли антильской (*Phaseolus angularis*) (6). Дальневосточный «тыквенный» изолят ВЖМФ, как и итальянские штаммы, поражает виды растений только трех семейств: *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, вызывая неяркую хлоротичную мозаику и крапчатость. Кроме того, изучаемый нами «тыквенный» изолят ВЖМФ отличается по биологическим свойствам от штаммов этого вируса, обнаруженных ранее в Приморском крае на растениях сои, клевера, фасоли и гладиолуса (8, 9).

Таким образом, впервые на Дальнем Востоке России на тыквенных овощных культурах идентифицирован вирус желтой мозаики фасоли (*Bean yellow mosaic virus*) — представитель рода *Potyvirus* (сем. *Potyviridae*). По внутривидовому разнообразию изолят ВЖМФ можно отнести к итальянским штаммам Z 1 и Z 2, выявленным на растениях цуккини. Пока отмечены единичные случаи заражения выделенным вирусом тыквенных овощных культур. Однако юг Дальнего Востока характеризуется муссонным климатом и жестким инфекционным фоном, вследствие чего имеются уникальные условия для быстрого распространения ВЖМФ на этих теплолюбивых растениях.

Авторы выражают благодарность В.Г. Корж за помощь в изучении антигенных и физико-химических свойств вируса, М.В. Сапоцкому за проведение электрофореза, Ю.В. Богунову за микрофотосъемку и Н.В. Моисеевой за техническую помощь при работе с растениями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gnutowa V., Tolkach V. Taxonomy of phytopathogenic viruses identified in the Russian Far-East. Arch. Phytopath. Pflanz., 2000, 33, 2: 187-205.
2. Гнutowa P.B., Толкач В.Ф., Чернявская Н.М. Штаммовое разнообразие вирусов, поражающих овощные культуры семейств *Cucurbitaceae* и *Solanaceae*. Бюл. Гл. Бот. Сада. 2003, 184: 189-193.
3. Chen S., Nitzan F. Identify of viruses affecting cucurbits in Izrael. Phytopathology, 1963, 53, 2: 193-196.
4. Толкач В.Ф. Идентификация и биологическая характеристика поти- и тобамовирусов (дальневосточные изоляты). Автореф. канд. дис. Владивосток, 1995.
5. Гнutowa P.B. Серология и иммунохимия вирусов растений. М., 1993.
6. Lovisolo O. Viruses diseases of *Cucurbitaceae* in the Mediterranean region. J. Phytiatric et de Phytopharmacie Circum-Medit., 1972: 1-13.
7. Provvidenti R., Uemoto J. Chlorotic leaf spotting of yellow summer squash caused by the severe strain of *bean yellow mosaic virus*. Plant Disease Report, 1973, 57, 3: 280-282.
8. Поливанова Т.А., Крылов А.В. Вирусы, идентифицированные на зернобобовых культурах в Приморском крае. В кн.: Взаимоотношение вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток, 1985: 87-93.
9. Толкач В.Ф., Гнutowa P.B. Новый штамм ВЖМФ, выявленный в Приморском крае на фасоли. Докл. РАСХН, 1999, 4: 10-12.

IDENTIFICATION OF RUSSIAN FAR-EAST ISOLATE OF BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS REVEALED ON CUCURBIT PLANTS

R.V. Gnutova, V.F. Tolkach

S u m m a r y

The authors presented the results of identification of bean yellow mosaic virus for the first time revealed on the South of Russian Far-East on the cucurbit plants with the symptoms of leaf chlorotic mosaic. On the basis of virions morphology and virus-induced inclusions in infected cells, symptomatology, host plants, physical, physico-chemical and antigenic properties of virus-specific and capsid proteins, and also infection by the aphids the virus has identified as bean yellow mosaic virus and it has the properties similar to Italian strains Z 1 and Z 2 revealed on zucchini, and it belongs to *Potyvirus* genus (*Potyviridae* family).