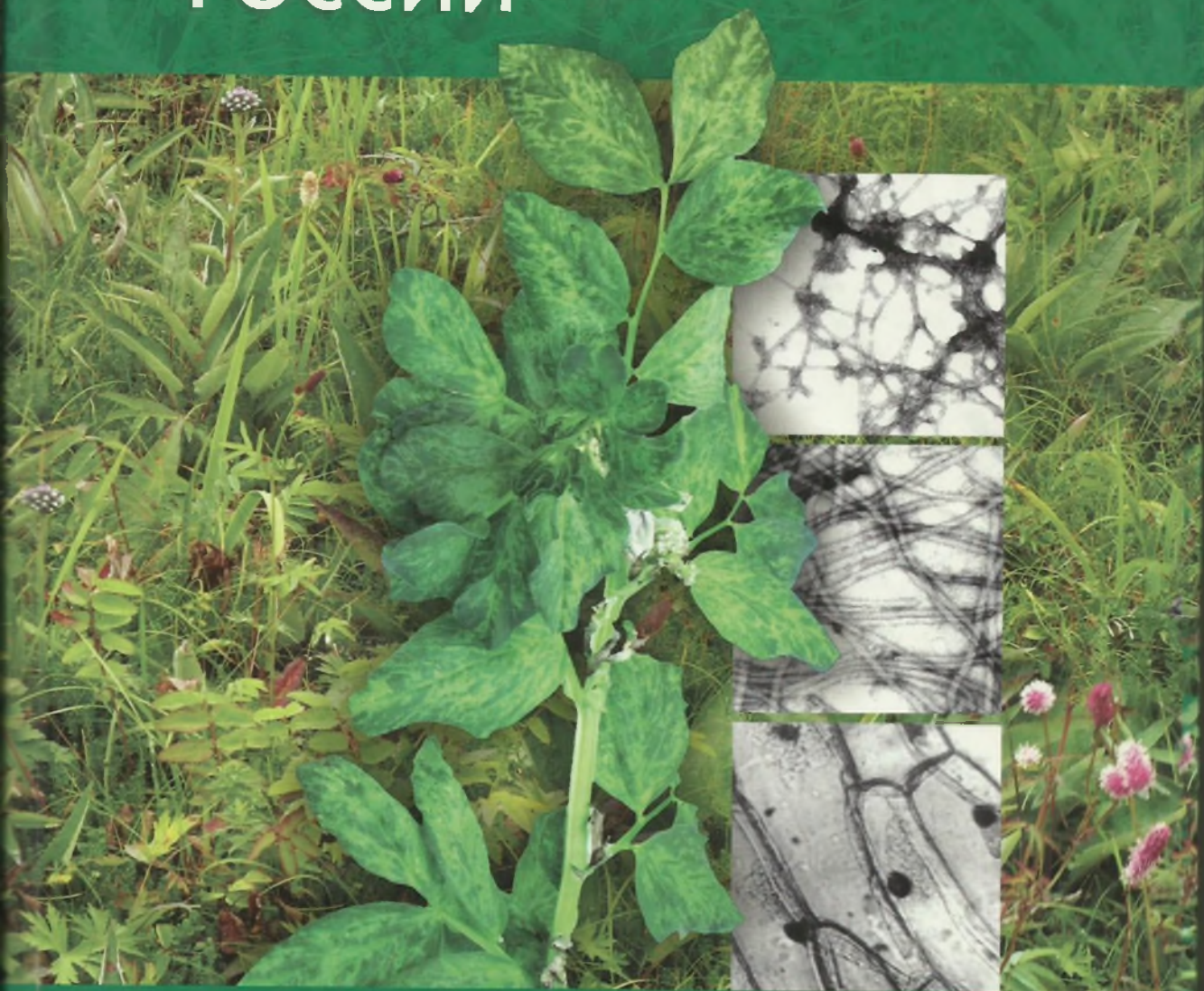


Р.В. Гнутова

# ТАКСОНОМИЯ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ



RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES  
FAR EASTERN BRANCH  
INSTITUTE OF BIOLOGY AND SOIL SCIENCE

R.V. GNUTOVA

**TAXONOMY OF PLANT VIRUSES  
OF THE RUSSIAN FAR EAST**



Vladivostok  
Dalnauka  
2009



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ИНСТИТУТ

Р.В. ГНУТОВА

**ТАКСОНОМИЯ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ  
ДАЛЬНОГО ВОСТОКА РОССИИ**



Владивосток  
Дальнаука  
2009

УДК 576.858

*ГНУТОВА Р.В. Таксономия вирусов растений Дальнего Востока России. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – 467 с.*

ISBN 978-5-8044-1029-3

В монографии отражены результаты исследований вирусов растений, поражающих растения в агро- и биоценозах, и география их распространения в Дальневосточном регионе. Приведены основные классические критерии идентификации дальневосточных изолятов вирусов при определении их таксономического статуса. Дан сравнительный анализ результатов собственных исследований с базой литературных данных. Изложена краткая история появления системы классификации вирусов и обсуждены успехи и проблемы таксономии и номенклатуры вирусов растений. Описана характеристика вирусов по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам капсидных белков и нуклеиновых кислот и др. Методами биологического тестирования изучен круг поражаемых растений различных семейств, симптоматология, морфология и размер вирионов. Выявлены специфические вирусные включения в клетках инфицированных растений, способы передачи вирусов семенами и насекомыми и индивидуальные особенности изолятов вируса. Приведены оригинальные данные по взаимоотношениям эпитопов капсидных белков вирусов как внутри рода, так и между штаммами и изолятами одного вида. Излагаются результаты по изменчивости отдельных видов. Для установления филогенетического положения и уточнения степени гомологии с ранее описанными за рубежом вирусами растений проведено секвенирование фрагментов генома некоторых приморских изолятов вирусов, поражающих овощные и декоративные культуры, и использованы методы их диагностики на основе ПЦР-систем. Дальневосточные изоляты вирусов растений описаны в соответствии с требованиями последнего доклада международного комитета по таксономии вирусов (2005 г.).

Предназначается для вирусологов, фитопатологов, молекулярных биологов, преподавателей и студентов биологических факультетов вузов и сельскохозяйственных академий, специалистов по защите растений.

Ил. 129, табл. 57, библи. 1021.

*GNUTOVA R.V. Taxonomy of plant viruses of the Russian Far East. – Vladivostok: Dalnauka, 2009. – 467 p.*

ISBN 978-5-8044-1029-3

The monograph compiles data on longterm researches of plant viruses, spread over the Russian Far-East. The results of the author's investigations surveyed on the analyses of literature data are given in the monograph. The world achievements and problems modern taxonomy and nomenclature of plant viruses are discussed. The short history of the appearance and develop of system of plant viruses classification are submitted. It is used the main classic of criterises of identification far-eastern isolates of plant viruses when described their taxonomy status. The characteristics on ring test-plants infection, symptomology, physical properties of virions, physicochemical and antigenic properties of protein and nucleic acids and et all are described. The original results on antigenic relationships analysis are shocon of capsid proteins epitops as plant viruses inside genus and inside strains and isolates the samesome species. The results on species changes are given. The far-eastern isolates of plant viruses are described and distribute in monograph according to the last Report ICTV (2005).

It's intended for virusologists, phytopatologists, molecular biologists, teachers and students of biological faculty in universities and agricultural Academies as were as for specialists in agricultural plants protection.

Ill. 129, tabl. 57, bibl. 1021.

Ответственный редактор д-р биол. наук *В.И. Малиновский*  
Рецензенты: д-р биол. наук *З.М. Азбукина*,  
д-р мед. наук *Г.Н. Леонова*, заслуженный деятель науки РФ

Утверждено к печати Ученым советом БПИ ДВО РАН

ISBN 978-5-8044-1029-3

© Гнутова Р.В., 2009  
© Дальнаука, 2009



---

## Предисловие от автора

---

В Дальневосточном федеральном округе (ДФО) изучать вирусы растений начали в конце 50–начале 60-х годов прошлого столетия под руководством В.Г. Рейфмана. В 1962 г. он организовал лабораторию общей вирусологии. До сих пор коллектив дальневосточных фитовирусологов, к большому сожалению, был и остается единственным научным подразделением на огромной азиатской территории России, который проводит исследования по биоэкологическому мониторингу, идентификации и таксономии вирусов растений в агро- и биоценозах.

В монографии приводятся результаты изучения не только РНК-геномных (наиболее распространенных среди вирусов растений), но и недавно идентифицированных на юге ДФО ДНК-геномных каулимовирусов, выявленных на растениях овощных культур семейства крестоцветных и георгине. На основании свойств дальневосточных изолятов вирусов (морфология вирионов и их размеры, симптомалогия, круг поражаемых растений из различных семейств, физические свойства вирионов, вирусные включения в инфицируемой клетке, физико-химические свойства вирусспецифических белков и нуклеиновых кислот, антигенные свойства капсидных белков) определялся таксономический статус идентифицированных в регионе вирусов. В последние годы на примере вирусов мозаики цветной капусты и мозаики георгины отработывались современные методические подходы для их идентификации на основе достижений молекулярной биологии – гибридизации со специфическими зондами, амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), определения первичной структуры генома, филогенетического анализа, что позволяет получать новые сведения о вирусах.

Кроме того, в результате сотрудничества с исследователями из КНР и КНДР изучались вирусы растений, имеющие общие пути распространения, переносчиков, растений-хозяев, состав вирусов и т.д. Азиатско-Тихоокеанский регион (АТР) – густо заселенная часть мира с интенсивным сельскохозяйственным производством, с чрезвычайно развитыми агроценозами и большим разнообразием возделываемых культур. Большое внимание к изучению вирусных заболеваний растений проявляют высоко развитые страны АТР. Например, в Японии выявлено более 200 вирусов, наносящих ущерб практически всем возделываемым культурам. В других странах (КНДР, Россия, КНР) идентификацию и изучение вирусов растений проводят менее интенсивно. В последние годы на российский ДВ рынок хлынул поток сельскохозяйственной продукции из стран АТР, главным образом из Китая. При этом распространенных и вредоносных вирусов и их переносчиков в Китае довольно много (Гнутова и др., 1996; *Plant viruses in Asia*, 1998). Нет гарантии, что из-за ослабленного в последнее десятилетие карантинного контроля с китайской продукцией растениеводства не завозятся новые вирусы растений, опасные для России.

К сожалению, огромный по территории ДФО до сих пор остается малоизученным по распространению вирусов на растениях культурной флоры, на сорной и дикорастущей растительности и по их вредоносности. Идентификация фитопатогенных вирусов, исследование их эпидемиологических характеристик (происхождение, пути распространения, взаимодействие с другими объектами сообществ) необходимы для разработки мероприятий по защите агро- и биоценозов от вирусных болезней.

К настоящему времени кардинально изменился уровень исследований вирусов в связи с внедрением в вирусологию молекулярно-генетических методов, что значительно расширяет возможности определения их таксономического статуса наряду с традиционными методами идентификации. Дальневосточные изоляты вирусов растений отнесены к 9 семействам, 19 родам и 47 видам согласно современным критериям классификации вирусов. Безусловно, для определения их таксономического статуса были использованы далеко не все критерии, необходимые для полной информации о вирусе. Но накопленный за многие десятилетия фактический материал о вирусах растений позволяет отразить современное состояние фитовирусологических исследований в ДФО по материалам собственных исследований и литературным данным отечественных, в том числе и дальневосточных, а также зарубежных исследователей. Не вызывает сомнений, что в дальнейшем списочный состав вирусов растений, обнаруженных на ДВ России, будет значительно расширен, но даже тот, который уже определен, требует анализа полученных данных, ответа на вопрос, почему тот или иной дальневосточный изолят вируса был отнесен именно к определенному виду, роду и семейству.

Всякая классификация – это система, облегчающая поиски информации (Метьюз, 1973). Классификация и номенклатура вирусов является одним из наиболее динамично и постоянно развивающихся и совершенствующихся разделов вирусологии. В настоящее время для таксономических целей используются характеристики вирусов, которые можно получить с помощью современных методов исследования. Это – морфология вирионов (размер и форма, присутствие и природа пепломеров, наличие оболочки, симметрия и структура капсида); физико-химические и физические свойства (молекулярная масса, плавучая плотность, коэффициент седиментации вириона, рН-стабильность, устойчивость к растворителям и облучению); тип изучаемой нуклеиновой кислоты и размер генома в тысячах пар оснований, количество нитей нуклеиновой кислоты, линейность или кольцевидность, полярность, количество и размер сегментов, нуклеотидная последовательность, присутствие элементов с повторяющейся последовательностью, наличие изометрии, соотношение G+C, наличие и тип 5'-концевого кэпа, 5'-концевых ковалентно связанных белков, наличие 3'-поли(А)-тракта; свойства белков (количество, размер и функциональная активность структурных и неструктурных белков, особенности функциональной активности таких белков, как транскриптаза, и др., аминокислотная последовательность, гликозилирование, фосфорилирование, картирование эпитопов капсидных белков); наличие и свойства липидов и углеводов.

В настоящее время при определении таксономического статуса вируса, кроме того, важно использовать результаты по организации и стратегии экспрессии генома



(количество и положение открытых рамок считывания, особенности транскрипции и трансляции, посттрансляционного процессинга, расположения сайтов аккумуляции вирионных белков и сборка вирионов), по антигенным свойствам капсидных белков вирусов и их антигенному родству внутри вида и рода, а также по биологическим свойствам (поражаемый круг растений-хозяев, симптомология, способ передачи в природе, связь с переносчиками, географическое распространение, патогенность, тканевой тропизм, патология, гисто- и цитопатология).

Следует обратить внимание на толкование некоторых терминов, используемых для отнесения вируса к определенному таксону. Термины «РНК-репликаза», «транскриптаза» и «полимераза» используются при описании синтеза вирусных РНК с особым значением. Термином «транскриптаза» обозначается фермент, вовлекаемый в синтез матричных РНК (мРНК): в большинстве случаев это полимеразы, входящие в состав вирионных белков. Репликазой является также фермент мелких плюс смысловых (+)РНК-содержащих вирусов, какими являются многие вирусы растений, у которых этот фермент транскрибирует геном в мРНК через промежуточную минус смысловую нить (-) и синтезирует геномную нить с этой же матрицы. Термин «РНК-полимераза» (например, РНК-зависимая РНК-полимераза) применяется при отсутствии различий между репликацией и транскрипцией при синтезе РНК, (+)РНК-геномных вирусов растений.

Автор благодарит коллег, чья помощь оказалась полезной при написании и подготовке рукописи к печати – Ю.В. Богунова, Н.М. Чернявскую, И.В. Гнутову, М.В. Сапоцкого, И.И. Сибирякову, П.Ю. Мамаева, Н.В. Рублеву, В.Г. Корж, Т.Ф. Коцарь, С.А. Романову, Ю.Г. Волкова, Н.Н. Какареку и других, без участия которых, книга бы не состоялась. Особую признательность выражаю В.Ф. Толкач, выполнившей, особенно за последние 15 лет большую работу по идентификации и изучению биологических свойств дальневосточных изолятов вирусов растений, а также редактору книги В.И. Малиновскому за ценные замечания и поддержку при подготовке рукописи к печати.

Доктор биол. наук, профессор  
*Р.В. ГНУТОВА*

---

## Список принятых сокращений

---

АД	– альдолаза
АКДС	– адсорбированная коклюшно-дифтерийно-столбнячная вакцина
АТР	– Азиатско-Тихоокеанский регион
А	– аспарагиновая протеиназа
Ас	– антисыворотка
Аг	– антиген
БО	– белок оболочки
БСА	– бычий сывороточный альбумин
БФС	– бромфеноловый синий
ВБА	– виробактериальная агглютинация
ГБЦВ	– ген белка цитоплазматических включений
ДВР	– Дальний Восток России
ДФО	– Дальневосточный федеральный округ
ДСН	– додецилсульфат натрия
дн	– двунитевая (нуклеиновая кислота)
ИФА	– иммуноферментный анализ
ИЭМ	– иммунная электронная микроскопия
КА	– капельная агглютинация
КБ	– капсидный белок
кДа	– килодальтон
КЭ	– коэффициент экстинкции
МАТ	– моноклональные антитела
МБА	– N,N'-метиленабисакриламид
МГНК	– метод гибридизации нуклеиновых кислот
мДа	– мегадальтон
МДРФ	– метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
МКТВ	– Международный комитет по таксономии вирусов
м.м.	– молекулярная масса
мРНК	– матричная РНК
МТ	– миелиноподобное тело
н.к.	– нуклеиновая кислота
нт.	– нуклеотид
он(+)-РНК	– однострелковая плюс-смысловая РНК-содержащих вирусов
ОРС	– открытая рамка считывания
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПАТ	– поликлональные антитела
ПВК	– пируваткиназа
ПДРФ	– полиморфизм длины рестрикционных фрагментов



п.н.	– пар нуклеотидов
поли (А)	– полиадениловая кислота (участок генома вируса)
ПРС	– предельное разведение инфекционного сока
ПСА	– персульфат аммония
ПСИ	– период сохранения инфекционности
ПХ	– пероксидаза хрена
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭГ	– полиэтиленгликоль м.м. 6000
РДД	– реакция двойной иммунодиффузии
РИА	– радиоиммунологический анализ
РИЭФ	– ракетный иммуноэлектрофорез
(–)РНК	– минус-смысловая РНК-геномных вирусов
СТАБ	– цетилтриэтиламмоний бромид
ТБЕ	– 0,089 М трис-НСI, рН 8,3; 0,089 М борная кислота; 0,0025 М ЭДТА
ТЕ	– 0,01 М трис-НСI, рН 7,6; 0,001 М ЭДТА
т. о.	– тысяч оснований
т. п. о. (т.п.н.)	– тысяч пар оснований (нуклеотидов)
ТТИ	– точка термической инактивации
ХТГ	– хемотрипсиноген А
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
D	– коэффициент диффузии
DAS-ELISA	– двойной антительный сэндвич-вариант ИФА
g	– градиент
IgG	– иммуноглобулин G
Lg	– иммуноглобулин
NZS	– N-концевой ядерный сигнал
PBS	– фосфатный солевой буфер
RFLP	– метод полиморфизма длин рестракторных фрагментов
RT	– обратная транскрипция
S <sub>20,w</sub>	– коэффициент седиментации в единицах Сведберга
ss-ДНК	– суперскрученная ДНК

#### Дальневосточные изоляты вирусов растений

АВК	– А-вирус картофеля
ВАМК	– вирус аукуба мозаики картофеля (F-вирус картофеля)
ВАТ	– вирус аспермии томатов
ВЕЛ	– вирус бессимптомности лилии
ВГТ	– вирус гравировки табака
ВДМГ 1	– вирус деформирующей мозаики гороха 1
ВЖКЛ	– вирус желтой карликовости лука
ВЖМФ	– вирус желтой мозаики фасоли

- 
- ВЗЗ – вирус закручивания злаков  
ВЗКМО – вирус зеленой крапчатой мозаики огурца  
ВЗРС – вирус задержки роста сои  
ВКВ – вирус короткоузлия винограда  
ВККК – вирус крапчатости красного клевера  
ВКПГ – вирус кольцевой пятнистости гортензии  
ВКПМ – вирус кольцевой пятнистости малины  
ВКПТ – вирус кольцевой пятнистости табака  
ВКПТо – вирус кольцевой пятнистости томата  
ВМА 1 – вирус мозаики арбуза 1  
ВМБК – вирус мозаики белого клевера  
ВМГ – вирус мозаики гиппеаструма  
ВМГе – вирус мозаики георгины  
ВМГЛ – вирус мозаики горошка ложносочевичного  
ВМГО – вирус мозаики горошка однопарного  
ВМК – вирус мозаики костра  
ВМКГ – вирус мозаики клевера гибридного  
ВМЛ – вирус мозаики люцерны  
ВМПА – вирус мозаики подорожника азиатского  
ВМР – вирус мозаики редиса  
ВМРе – вирус мозаики резухи  
ВМС – вирус мозаики сои  
ВМТ – вирус мозаики турнепса  
ВМТо – вирус мозаики томата  
ВМЦК – вирус мозаики цветной капусты  
ВМЦКо – обычный штамм вируса мозаики цветной капусты  
ВНТ – вирус некроза табака  
ВОМ – вирус огуречной мозаики  
ВОМФ – вирус обыкновенной мозаики фасоли  
ВПТ – вирус погремковости табака  
ВПТю – вирус пестролепестности тюльпана  
ВСМЗ – вирус северной мозаики злаков  
ВСЛК – вирус скручивания листьев картофеля  
ВТБ – вирус традесканции белоцветковой  
ВТМ – вирус табачной мозаики  
ВШР – вирус штриховатости риса  
ВШМЯ – вирус штриховатой мозаики ячменя  
МВК – М-вирус картофеля  
SBK – S-вирус картофеля  
ХВК – Х-вирус картофеля  
УВК – У-вирус картофеля



## Обозначения симптомов вирусного поражения растений

Alb	– альбинизм
BdVe	– окаймление жилок
Br	– яркий
BusSt	– кустистая карликовость
Gr	– зеленый
GrBdVe	– зеленое окаймление жилок
GrM	– зеленая мозаика
GrRM	– зеленая кольцевая мозаика
C	– посветление
Cl	– хлороз, хлоротичный
ClBdVe	– хлоротичное окаймление жилок
ClM	– хлоротичная мозаика
ClMot	– хлоротичная крапчатость
ClStr	– хлоротичная штриховатость
ClVe	– хлороз жилок
Curl	– курчавость, курчавый
Dis	– деформация листьев
DisVe	– стягивание (деформация) жилок
Dot	– точечный
L	– локальное поражение
L: N	– локальные некрозы
L: SP	– локальные пятна
M	– мозаика
Mot	– мозаичная крапчатость
MSp	– мозаичная пятнистость
N	– некрозы
NDot	– некротические точки
NR	– некротические кольца
NSp	– некротические пятна
RM	– кольцевая мозаика
Rol	– скручивание листьев
RSp	– кольцевая пятнистость
S	– системное поражение
Sp	– пятнистость
Stu	– задержка роста
SmLeaf	– измельчение листьев
VC	– посветление жилок

---

## Современная таксономия и номенклатура вирусов растений

---

Вирусология – наука молодая, ее история началась с конца XIX века. У истоков стояли трое ученых, каждый из которых не подозревал, что имеет прямое отношение к открытию нового класса патогенов – вирусов. Немец голландского происхождения Мартин Бейеринк в 1896 г. поставил опыты по передаче вируса от больного растения к здоровому. Но так как это было время бурного развития микробиологии, то он заключил, что возбудителем болезни является бактерия. Наш соотечественник Дмитрий Иосифович Ивановский, изучая мозаичную болезнь на плантациях табака на юге России, в 1892 г. выявил, что ее помимо бактерии вызывает новый тип возбудителя болезни. Голландец Адольф Мейер спустя 6 лет, в 1898 г., на основании данных Д.И. Ивановского и собственных опытов назвал новый инфекционный агент «жидкое инфекционное начало» – *vivum fluidum*. Вскоре было установлено, что многие болезни животных и растений вызываются подобными патогенами, которых стали называть фильтрующими вирусами, так как они проходили через фильтры Шамберлена. За рубежом М. Бейеринка считают первооткрывателем вирусологии. Однако большинство отечественных вирусологов приоритет в открытии вирусов отдают Д.И. Ивановскому и годом открытия вирусов считают 1892-й. В середине прошлого столетия в Москве был создан институт вирусологии РАМН, названный его именем.

Начинала свой путь вирусология как наука с накопления знаний о болезнях человека, животных, растений, бактерий и насекомых, вызываемых вирусами. В настоящее время вирусология развивается в направлении изучения законов современной биологии на молекулярном уровне (молекулярная вирусология), основываясь на том, что вирусы являются частью биосферы и важным фактором эволюции органического мира.

Развитие вирусологии как фундаментальной науки началось в 30-е годы с работ по изучению природы и свойств вирусов. При этом исследователи столкнулись с проблемами, требующими определенной систематики изученных вирусов. Уже в те годы было понятно, что классификация вирусов с разделением их на родственные группы представляет большую практическую ценность. Она позволяла вновь обнаруженный вирус сравнивать с уже известными и по совокупности схожих свойств относить неизвестный вирус к определенной группе. Начинают появляться публикации, в которых были представлены первые попытки систематизировать вирусы. Так, Дж. Джонсон (Johnson, 1927) предложил называть вирусы по растению-хозяину с добавлением порядкового номера, например, для ВТМ – табачный вирус 1. Вопрос о необходимости разработки какой-то общей системы для вирусов растений был поднят на заседании V Международного ботанического конгресса в Кембридже (Англия). Чуть позже выделили 5 критериев (Johnson, Hoggan, 1935), по которым, по мнению авторов, вирусы можно было как-то сгруппировать. Подобная классификация охватывала около 50 ви-



русов растений и включала следующие критерии: симптомы, вызываемые вирусом у растений, способ передачи вируса от больного к здоровому растению, природные и дифференцирующие растения-хозяева, а также два типа физических свойств вирионов – период (время) сохранения инфекционности вируса в соке больного растения *in vitro* (ПСИ) и точку термической инактивации (ТТИ), т. е. температуру, при которой вирус сохраняет свою способность заражать растения. Однако несовершенство подобной классификации было в том, что в одну группу попадали вирусы, существенно различающиеся между собой по многим критериям идентификации.

Классификация вирусов растений, разработанная К. Smith (1937), основывалась на названии рода растения-хозяина, в котором вирусы были впервые обнаружены. По этой системе объединялись болезни, вызываемые вирусами, но не они сами. Позже F. Holms (1939) попытался объединить уже 89 вирусов по симптомам и способу передачи, используя биноминальные и тринминальные латинские названия. Этот исследователь выделил вирусы растений, бактерий и животных в третий мир живой природы – «Vira». Данная классификационная схема выгодно отличалась от других и была в то время одобрена номенклатурной комиссией американского фитопатологического общества.

В течение последующих лет были сделаны попытки создания более естественных классификаций вирусов растений. Ф. Боуден (1952) с появлением электронного микроскопа предложил сгруппировать вирусы по размеру, форме частиц и антигенным свойствам вирусных белков. По этим критериям он выделил 17 групп вирусов. Дж. Брандес с соавт. (Brandes, Wetter, 1959; Brandes, Bercks, 1965) показали, что наряду с антигенными свойствами и морфологией вирионов в качестве критериев можно использовать еще природных переносчиков и стабильность вирусов.

В последующие годы предпринимались неоднократные попытки создания приемлемой системы, объединяющей вирусы, как среди отечественных, так и зарубежных исследователей. Советские вирусологи В.Л. Рыжков (1952), К.С. Сухов (1956), А.Е. Проценко (1966) и др. выдвигали различные схемы для разработки оптимальной классификации вирусов. При этом их значимость определялась, естественно, состоянием изученности вирусов растений, которое в те годы было еще далеко от совершенства.

Итак, классификация представляла собой, с одной стороны, источник накопления данных и их последующее уточнение – с другой. Самые передовые классификационные системы строились в тот период, когда о вирусах было известно еще очень мало, поэтому использовали обычно небольшое число очевидных простых признаков, группируемых вирусы. Эти классификации носили отчасти искусственный характер. Более совершенная систематика связана с применением более глубокого анализа и привлечения большего числа критериев идентификации вирусов. В конце 60-х – начале 70-х годов прошлого столетия отмечается расцвет молекулярно-биологических методов. Достижения в области химии, молекулярной биологии и генетики легли в основу методической базы научных исследований, которые стали применяться не только на уровне методик, но и целых технологий, где вирусы стали выступать не только как объекты исследований, но и как инструмент (Атабеков, 1971, 1975; Fenner, 1976).

Были разработаны и применены для изучения вирусов современные методики изучения белков и нуклеиновых кислот. Р. Метьюз (1973), используя результаты, достигнутые в то время, предложил более совершенную по сравнению с другими классификацию. Она была одобрена большинством фитовирусологов.

Из отечественных исследователей вопросами систематики вирусов в прошлом столетии, помимо перечисленных выше В.Л. Рыжкова, К.С. Сухова и А.Е. Проценко, занимались В.М. Жданов, Л.К. Львов, Ф.И. Ершов (1981), позже А.В. Крылов, а также украинские исследователи В.Г. Краев, А.Л. Бойко, В.П. Полищук (Полищук и др., 2001) и др. Результаты дальневосточных фитовирусологов по идентификации вирусов растений за первые 30 лет изучения обобщил А.В. Крылов (1987, 1992). До него В.Г. Краев в коллективной монографии (В.И. Билай и др., 1988) дал характеристику многим вирусам растений, идентифицированным не только в Украине, но и в других регионах бывшего СССР. Кроме того, им по материалам VI Доклада Международного комитета по таксономии вирусов (МКТВ) в 2000–2001 гг. были опубликованы новейшие для того времени сведения о семействах, родах и видах вирусов растений.

Работы А.В. Крылова и В.Г. Краева, благодаря их обобщающему характеру, сыграли свою определенную роль при написании предлагаемой читателю монографии. Однако после их опубликования в конце прошлого–начале нынешнего веков накопились новые сведения о вновь идентифицированных вирусах (главным образом на ДВР), которые требовали сравнительного анализа с данными о вирусах, представленных в литературе. В монографии дальневосточные изоляты вирусов описываются и распределяются по семействам, родам и видам в соответствии с последними требованиями МКТВ. Некоторые новые семейства, роды и виды описаны не только для ДФО, но и других регионов России.

Таксономия и номенклатура вирусов растений начала формироваться в середине прошлого века, когда данные о вирусах были еще слишком разрозненными, чтобы служить основой для их относительно универсальной классификации. По мере накопления данных в различных областях вирусологии критерии систематики вирусов совершенствовались и дополнялись. За низшую таксономическую единицу вирусов растений был принят «штамм». Определение «вид» для вируса, предложенное К.С. Суховым (1956) и А.Е. Проценко (1966, 1977), вначале не получило широкого распространения, скорее всего, из-за недостаточной в то время надежности критериев, характеризующих видообразование вирусов как биологических объектов. Кроме того, в те годы шла бурная дискуссия по поводу отнесения вирусов к живой или неживой природе, что также не способствовало внедрению данного термина.

В 1966 году в Москве был учрежден Международный комитет по номенклатуре вирусов (МКНВ). В него вошли 130 представителей микробиологических обществ из многих стран. В его задачу входило создание универсальной таксономической системы для всех вирусов. Чуть позже этот комитет был переименован и стал называться Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Он стал работать на базе международного союза микробиологических обществ. Для анализа данных о свойствах вирусов было учреждено



5 подкомиссий, в которые вошли 12 вирусологов с мировым именем. Подобная реорганизация МКНВ способствовала устранению в вирусологии значительной неопределенности, которая до 1973 года выражалась в большом количестве синонимов при названии вирусов, наличием различных латинизированных биноминальных номенклатур для наименования вирусов, а также предложенных разными авторами классификационных схем, которые продолжались разрабатываться исследователями как для вирусов позвоночных, так и вирусов растений.

В ряде публикаций для характеристики вируса в те годы стали применяться криптограммы, предложенные еще в 60-е годы прошлого века А. Гиббсом и Б. Харрисоном (Gibbs et al., 1966; Gibbs, Harrison, 1968) (цит. по: Гиббс, Харрисон, 1978). В них в закодированном виде содержались сведения о свойствах вирусов растений. Они состояли из четырех пар критериев: тип нуклеиновой кислоты (R – РНК, D – ДНК) / число (1 – одноцепочечных и 2 – двухцепочечных) цепей в молекуле; молекулярная масса (м.м.) в миллионах дальтон нуклеиновой кислоты (нк) / содержание нк (в процентах); форма вириона / форма нуклеокапсида (S – близкая к сферической, X – сложная или же частица не принадлежит ни к одному из перечисленных типов, U – удлинённая с параллельными сторонами и закругленными концами, E – удлинённая, но не с закругленными концами); вид инфицируемого хозяина / тип переносчика (Ar – тли, Ac – клещи, Au – цикадки, Ne – нематоды, O – растения заражаются без помощи переносчика, \* – информация о данном вирусе отсутствует). Например, криптограмма ВТМ выглядела так: R/1; 2/5; E/E; S/O (Harrison, 1980). Однако со временем криптограммы потеряли свою актуальность.

В 1988 году на Международном конгрессе вирусологов в Нидерландах МКТВ принял классификацию вирусов растений, включающую более 30 групп и несколько семейств. На тот период впервые основной таксономической единицей родственных вирусов растений стала группа. Причем вирусы растений и вирусы человека и животных составляли самостоятельные группы. Классификация вирусов растений по группам (табл.1) послужила основой при идентификации вирусов растений и просуществовала почти два десятилетия. Основными критериями этой классификации стали следующие: тип н.к. вирусов (РНК- или ДНК-); м.м. н.к., число цепей (одно- или двухцепочечная); морфология вирионов – форма и размеры; антигенные свойства капсидных белков; температура, при которой вирус теряет свою инфекционность; специализация вирусов; способы передачи вирусной инфекции; симптоматология и др.

Кратко остановимся на другом, не менее важном для вирусологии, вопросе – номенклатуре вирусов, в частности вирусов растений. В начале прошлого столетия свои названия вирусы растений обычно получали в соответствии с характером симптомов заболевания, вызываемых ими у растения. Если это была мозаика на листьях, то вирусы получали названия – мозаика табака, мозаика турнепса, огуречная мозаика и т.д. При другой реакции растения – вирус кольцевой пятнистости гвоздики, вирус желтой мозаики сахарной свеклы, вирус карликовости риса и т.д. Такие тривиальные названия, несмотря на громоздкость, используются до сих пор и часто употребляются в сокращенном виде до нескольких букв. Например, вирус табачной мозаики – ВТМ,

## Классификация вирусов растений по группам (по: Francki et al., 1991)

№ п/п	Группа	Вирус
1	<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>
2	<i>Cappilovirus</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>
3	<i>Carlavirus</i>	<i>Carnation latent virus</i>
4	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>
5	<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
6	<i>Closterovirus</i>	<i>Sugar beet yellows virus</i>
7	<i>Commelina yellow mottle virus</i>	<i>Commelina yellow mottle virus</i>
8	<i>Comovirus</i>	<i>Cowpea mosaic virus</i>
9	<i>Cryptovirus</i>	
	Subgroup 1	<i>White clover cryptic virus 1</i>
	Subgroup 2	<i>White clover cryptic virus 2</i>
10	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
11	<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>
12	<i>Fabavirus</i>	<i>Broad bean wilt virus</i>
13	<i>Furovirus</i>	<i>Soilborn wheat mosaic virus</i>
14	<i>Geminivirus</i>	
	Subgroup 1	<i>Maize streak virus</i>
	Subgroup 2	<i>Beet curly top virus</i>
	Subgroup 3	<i>Bean golden mosaic virus</i>
15	<i>Hordevirus</i>	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
16	<i>Illavirus</i>	<i>Tobacco streak virus</i>
17	<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
18	<i>Marafivirus</i>	<i>Maize rayado fino virus</i>
19	<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>	<i>Maize chlorotic dwarf virus</i>
20	<i>Nepovirus</i>	<i>Tobacco ringspot virus</i>
21	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>
22	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>
23	<i>Pea enation mosaic virus</i>	<i>Pea enation mosaic virus</i>
24	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>
25	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>
26	<i>Rhabdovirus</i>	
	Subgroup A	<i>Lettuce necrotic yellow virus</i>
	Subgroup B	<i>Potato yellow dwarf virus</i>
27	<i>Sobemovirus</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i>
28	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice stripe virus</i>
29	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
30	<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>
31	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
32	<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>

вирус крапчатости гвоздики – ВКГ и т.д. Эти краткие сокращения пытались систематизировать и привести к какому-то определенному стандарту. Однако во избежание недоразумений и ошибок их следует всегда расшифровывать. Данное правило одина-



ково как для вирусов в русской транскрипции, так и в английской. Это следует делать еще и потому, что довольно часто вирусы в английской транскрипции в сокращении могут выглядеть одинаково, хотя это разные вирусы, например: вирус мозаики люцерны – *Alfalfa mosaic virus (AMV)*, вирус мозаики резухи – *Arabis mosaic virus (AMV)*, вирус крапчатости абрикоса – *Apricot mottle virus (AMV)*. То же самое можно отметить и для названия вирусов в русской транскрипции – вирус мозаики резухи (ВМР), вирус мозаики редиса (ВМР) и т.д.

Таким образом, названия вирусов растений, несмотря на всевозможные многочисленные, но не получившие поддержки попытки придать им «международный вид», до сегодняшнего дня остаются тривиальными. В основном они образованы при первоначальном выделении и описании вируса и соответствуют внешним симптомам проявления вирусной инфекции у растений, например: вирус желтой карликовости лука, вирус кольцевой пятнистости табака, вирус мозаики арбуза и т.д. В силу исторических причин и преобладания англоязычной вирусологической литературы в международной практике наряду с национальными вариантами названий используются английские названия вирусов. Это одобрено МКТВ, поэтому в нашей отечественной литературе обычно название вируса на русском языке дополняется английским названием.

Согласно «Списку вирусов растений» (Plant Viruses Online-Index to Virus Species, 1996) известно более 4000 вирусов растений. Однако в результате открытия новых вирусов, а также разработки и усовершенствования методов идентификации количество их ко времени, когда читатель будет знакомиться с данной монографией, безусловно, возрастет. Следует отметить, что как среди вирусов растений, так и вирусов, поражающих животных, человека, насекомых и бактерии, имеется немало представителей, которые пока не классифицированы. Это объясняется отсутствием фундаментальных данных по структуре вирусного генома, морфологии, биологическим, физическим, физико-химическим, антигенным и другим их свойствам. При попытке классификации возникает две взаимосвязанные проблемы. Первая – выявление родственных вирусов. Для этого берутся наиболее стабильные свойства вирусов (тип н.к., морфология частиц, тип переносчика, антигенные свойства капсидных белков и т.д.). Вторая – установление различий между родственными вирусами и выявление степени родства между вирусами внутри определенной группы (симптомы, круг растений-хозяев, особенности вирусного генома, аминокислотный состав белка и т.д.).

Идеал, к которому стремятся вирусологи всего мира, – создать такую классификацию, которая бы отражала эволюционные, фенотипические и молекулярные свойства вирусов и обеспечивала бы удобную и рациональную систему номенклатуры. МКТВ всегда был и остается сейчас весьма представительным и авторитетным органом, объединяющим интенсивную работу по анализу родственных по свойствам вирусов для отнесения их к определенному таксону. Наиболее известные ученые-вирусологи многих стран работают в разных подразделениях МКТВ – Исполнительном комитете, Координационном комитете, подкомитетах и научных группах. За время работы МКТВ было опубликовано около десятка фундаментальных Докладов с интервалом 3–6 лет.

Они являлись и остаются на сегодняшний день международным уставом в таксономии вирусов, которым обязаны руководствоваться в своей работе и в публикациях вирусологи всех стран. В этих Докладах продемонстрирован впечатляющий прогресс по таксономии и номенклатуре вирусов, в полной мере отражающий историю и стремительное развитие самой вирусологии во второй половине XX–начале XXI века, приведшие ее в авангард наук молекулярно-биологического уровня. Именно применение методов молекулярной биологии в фундаментальных исследованиях вирусов и изучение способов экспрессии вирусного генома, наряду с углубленными исследованиями биологии вирусов, позволили МКТВ предложить в последние годы наиболее обоснованную систему по таксономии вирусов. Для этих целей были использованы данные о структуре и последовательности генома, количестве и расположении в нем транслируемых участков, то есть ОРС, вместе с классическими критериями идентификации – биологическими, физико-химическими свойствами вирусспецифических белков и н.к., физическими свойствами вирионов, антигенными и иммуногенными свойствами капсидных белков (КБ), специфическими особенностями морфологии вирионов. Существенное значение при этом имела интенсификация исследований не только в странах, где эти работы были уже традиционными, но и тех, где подобными исследованиями не занимались. Произошло расширение географического ареала выявления вирусов в агро- и биоценозах, что способствовало выявлению новых вирусов.

На такой фундаментальной научной основе до марта 2000 г. полноправным таксономическим международным документом был VI Доклад МКТВ по таксономии вирусов «Классификация и номенклатура вирусов», вышедший в 10-м приложении к журналу *Archives of Virology* в 1995 г. Издательский коллектив возглавлял Dr. Frederick A. Murphy (School of Veterinary Science, University of California, Davis, USA). Согласно правилам этого Доклада в универсальной таксономической системе предполагался классический вариант таксономии для биологических объектов, включающий следующие иерархические уровни – порядок, семейство, подсемейство, род и вид (вирус), как это принято в других биологических науках. Ниже приводим формулировку каждого таксона.

**Порядок** (*Order*) вирусов – это собрание семейств с общими характеристиками, отличающими их от других порядков и семейств. Он обозначается наименованием порядка с суффиксом *-virales*. Сейчас выделено 3 порядка: *Caudovirales*, *Mononegavirales* и *Nidovirales*.

**Семейства** (*Family*) и **подсемейства** (*Subfamily*) объединяют роды вирусов с общими характеристиками, отличающимися от свойств вирусов других семейств. Они обозначаются наименованием с суффиксами *-viridae* для семейства и *-virinae* для подсемейства. Морфология вирионов, структура генома и/или стратегия репликации, указывающие на филогенетические разобщения, являются наиболее отличительными признаками для семейств.

**Род** (*Genus*) вирусов представляет собой группы вирусов, имеющие общие свойства и отличающиеся по этим критериям от других родов вирусов. Они обо-



значаются наименованием с суффиксом *-virus*. Роды не однородны по своему составу. Некоторые представлены одним видом, например *Tenui-*, *Nano-*, *Tospovirus* и др. Однако чаще в род входит от 10 до 20–30 видов. Но есть род *Potyvirus*, включающий не только около 200 истинных видов, но еще и те, которые предстоит более точно идентифицировать. При этом следует особо подчеркнуть тот факт, что таксономическая категория рода наиболее характерна для вирусов растений, поскольку только у них несколько родов, именованных ранее группами, объединили в семейства. Эта тенденция, вероятно, будет усиливаться при дальнейшем углубленном изучении вирусного генома и получении доказательств филогенетического различия между видами – членами родов.

**Вид (*Species*)** вируса. Видовой таксон является наиболее важной иерархической единицей в системе любой классификации. В настоящее время именно он является основной в формировании выше названных таксонов вирусов растений.

В 90-е годы прошлого века была предпринята первая попытка объединения всех известных вирусов в 42 семейства и 122 рода (Murphy et al., 1995). Вирусы растений в данной универсальной системе были представлены в 42 родах и 10 семействах, 4 из которых являлись семействами, общими для вирусов растений и вирусов некоторых грибов, животных и человека. Это днРНК-вирусы семейства реовириды *Reoviridae*. В него входили вирусы растений из родов: фитореовирусы *Phytoreovirus*, фидживирусы *Fijivirus* и оризавирусы *Oryzavirus*. В семейство партитивириды *Partitiviridae* (основу составляют вирусы, поражающие грибы) были включены роды вирусов растений – альфакриптоввирусы *Alphacryptovirus* и бетакриптоввирусы *Betacryptovirus*. Семейство рабдовириды *Rhabdoviridae* представлено было вирусами растений 2 родов – циторабдовирусы *Cytorhabdovirus* и нуклеорабдовирусы *Nucleorhabdovirus*. И, наконец, семейство буньявириды *Bunyaviridae*, которое включало 2 рода вирусов растений – tenuивирусы *Tenuivirus* и тосповирусы *Tospovirus*. Эти семейства входили в состав порядка мононегавириалес *Mononegavirales* вместе с семействами и родами вирусов других организмов (семейства парамиксовириды *Paramyxoviridae* и филовириды *Phyloviridae*) с отрицательным однонитевым РНК-геномом.

Другие 6 семейств – джемивириды *Geminiviridae*, секвуивириды *Sequiviridae*, томбусвириды *Tombusviridae*, бромовириды *Bromoviridae*, комовириды *Comoviridae* и потивириды *Potyviridae* – включали только фитовирусы с ДНК и (+)РНК-геномом.

Многие вирусы растений на тот период времени не были включены в какие-либо семейства и были объединены в 21 род, которые получили название «плавающие» роды, но имели разную природу генома: днДНК, он(–)РНК или он(+)-РНК.

Данная таксономическая система в течение 1995–1999 гг. в результате активной работы комитетов и научных групп МКТВ и на основании новых данных о молекулярных свойствах вирусов была подвергнута значительному изменению, появились новые роды и были сформированы новые семейства вирусов растений.

Сложно представить филогенетическую связь родов, так как невозможен сам процесс реконструкции развития вирусного мира ввиду отсутствия ископаемых форм, как в других областях биологии. Слишком разнообразно строение вирусных

геномов, трудно установить общее происхождение. Но поскольку мир вирусов богат различными формами существования, несмотря на кажущуюся простоту организации вирионов, классификация вирусов всегда будет длительным процессом. Тем не менее в последние годы работами некоторых исследователей было показано, что классификация вирусов отражает также и эволюционные связи. Это нашло отражение в исследовании нуклеотидных последовательностей видов рода тимовирусов *Tymovirus*, которые сравнивались у следующих вирусов этого рода – желтой мозаики турнепса *Turnip yellow mosaic virus*, мозаики баклажана *Eggplant mosaic virus* и желтой мозаики страстоцвета *Passion fruit yellow mosaic virus*. Установлено, что род тимовирусов близок к родам потекс- и карлавирусам, и это указывает на их эволюционное родство (Ding et al., 1990). Украинские исследователи (Грамма, Майор, 1990) выявили наличие общих аминокислотных последовательностей в  $\alpha$ -спиралях белков оболочек ВТМ и потексвирусов, что также позволяло предполагать их общее происхождение. М. Najimorad с соавт. (1990) получили 25 мышинных моноклональных антител (МАТ) к 5 антигеннородственным штаммам вируса мозаики люцерны, но различным по биологическим свойствам. Одно из МАТ распознавало эпитоп, общий для исследованного вируса и вируса огуречной мозаики. Вполне естественно, что новые факты давали информацию об эволюционном родстве этих вирусов из двух разных семейств.

Обновленная таксономия вирусов, в том числе и вирусов растений, изложена в VII Докладе МКТВ, который вышел из печати в марте 2000 г. в виде фундаментального тома на 1124 страницах в издательстве Academic Press, США. Издателями этого нового документа по таксономии вирусов стал ряд авторитетных вирусологов с мировым именем во главе с ведущим и авторитетнейшим М.Н.В. Van Regenmortel. Согласно этому Докладу современная классификация вирусов приобрела новый вид, объединив вирусы позвоночных, растений и микроорганизмов. Универсальная таксономическая система была представлена 3 порядками, 64 семействами и 233 родами, в том числе 24 «плавающими» родами (Mayo, 1999; Pringle, 1999). Таксономическая структура вирусов растений после опубликования этого Доклада МКТВ представлена в следующем виде (табл. 2).

Таблица 2

Классификация вирусов растений (по материалам VII Доклада МКТВ, 2000 г.)

Геном	Семейство	Род	Типовой вид
ДНК	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caulimovirus</i> « <i>SbCMV-like viruses</i> » <i>CsCMV-like</i> <i>PVCV-like viruses</i> « <i>RTBV-like viruses</i> » <i>Badnavirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i> <i>Soybean chlorotic mottle virus</i> <i>Cassava vein mosaic virus</i> <i>Petunia vein clearing virus</i> <i>Commelina yellow mottle virus</i> <i>Rice tungro bacilliform virus</i>
ssДНК	<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i> <i>Curtovirus</i> <i>Begomovirus</i> <i>Topocuvirus</i>	<i>Maize streak virus</i> <i>Beet curly top virus</i> <i>Been golden yellow mosaic virus</i> <i>Tomato pseudocurly top virus</i>



Геном	Семейство	Род	Типовой вид
ssДНК	Не определено	<i>Nanovirus</i>	<i>Subterranean clover stunt virus</i>
dsPHK	<i>Reoviridae</i>	<i>Phytoreovirus</i>	<i>Wound tumor virus</i>
		<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease virus</i>
		<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>
dsPHK	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	<i>White clover cryptic virus 1</i>
		<i>Betacryptovirus</i>	<i>White clover cryptic virus 2</i>
	Не определено	<i>Varicosavirus</i>	<i>Lettuce big-vein virus</i>
(-) ssPHK	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>Lettuce necrotic yellows virus</i>
		<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Potato yellow dwarf virus</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>
	Не определено	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice stripe virus</i>
	-)-	<i>Ophiovirus</i>	<i>Citrus psorosis virus</i>
(+) ssPHK	<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
		<i>Illavirus</i>	<i>Tobacco streak virus</i>
		<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>
		<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
		<i>Oleavirus</i>	<i>Olive latent virus 2</i>
	<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Bean yellows virus</i>
		<i>Crinivirus</i>	<i>Lettuce infections yellow virus</i>
	<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Cowpea mosaic virus</i>
		<i>Fabavirus</i>	<i>Tobacco ringspot virus</i>
		<i>Nepovirus</i>	<i>Broad bean wilt virus 1</i>
<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus - S"-VPg</i>	
	<i>Potterovirus</i>	<i>Potato leafroll virus</i>	
	<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>	
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>	
	<i>Rymovirus</i>	<i>Ryegrass mosaic virus</i>	
	<i>Bymovirus</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	
	<i>Macluravirus</i>	<i>Maclura mosaic virus</i>	
	<i>Ipomovirus</i>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	
<i>Sequiviridae</i>	<i>Sequivirus</i>	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>	
	<i>Waikavirus</i>	<i>Rice tungro spherical virus</i>	
<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato byshy stunt virus</i>	
	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>	
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>	
	<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>	
	<i>Machlomovirus</i>	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	
	<i>Avenavirus</i>	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>	
	<i>Aureusvirus</i>	<i>Pothos latent virus</i>	
	<i>Panicovirus</i>	<i>Panicum mosaic virus</i>	

Геном	Семейство	Род	Типовой вид
(+) ssPHK	Не определено	<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>
		<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
		<i>Hordeivirus</i>	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
		<i>Furovirus</i>	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>
		<i>Pomovirus</i>	<i>Potato mop-top virus</i>
		<i>Pecluvirus</i>	<i>Peanut clump virus</i>
		<i>Benyvirus</i>	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
		<i>Sobemovirus</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i>
		<i>Marafivirus</i>	<i>Maize rayado fino virus</i>
		<i>Umbravirus</i>	<i>Carrot mottle virus</i>
		<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>
		<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>
		<i>Ourmiavirus</i>	<i>Ourmia melon virus</i>
		<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>
		<i>Carlavirus</i>	<i>Carnation latent virus</i>
		<i>Foveavirus</i>	<i>Apple stem pitting virus</i>
		<i>Allexivirus</i>	<i>Shallot virus X</i>
		<i>Capilovirus</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>
<i>Trichovirus</i>	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>		
<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i>		
<i>Mandarivirus</i>	<i>Indian citrus ringspot virus</i>		

Примечание. Жирным шрифтом выделены вновь образованные семейства и роды.

Как видно из данных табл. 2, на основе ранее отдельных родов каулимовирусы *Caulimovirus*, лютеовирусы *Luteovirus* и кластеровирусы *Closterovirus* преобразованы в три новые семейства: каулимовирида *Caulimoviridae*, лютеовирида *Luteoviridae* и кластеровирида *Closteroviridae*. Рассмотрим более подробно структуру этих новых семейств.

Семейство *Caulimoviridae* объединяет вирусы растений с разной морфологией, но одинаковым днДНК-геномом и способностью к обратной транскрипции в одной из стадий репликации вирусного генома. В нем выделены новые роды.

#### Структура семейства *Caulimoviridae*

<u>Роды:</u>	<u>Типовой вид рода</u>	<u>Отличия</u>
<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	6 ОРС
« <i>SbCMV-like viruses</i> »	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	7 ОРС
« <i>CsCMV-like viruses</i> »	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	5 ОРС
« <i>PVCV-like viruses</i> »	<i>Petunia vein clearing virus</i>	2 ОРС
<i>Badnavirus</i>	<i>Commelina yellow mottle virus</i>	3 ОРС, бацилл. ч-цы
« <i>RTBV-like viruses</i> »	<i>Rice tungo baciliform virus</i>	4 ОРС, -»-



Таким образом, классификация *Caulimoviridae* базируется в основном на структуре генома, положении и количестве генетических элементов в геноме, которые определяют отличия в биологических свойствах вирусов.

Семейство *Geminiviridae* (онДНК-кольцевая) не является новым, но роды в нем были переименованы и получили другое название: род мастревирусы *Mastrevirus* (подгруппа I *Geminiviridae*), род цуртоввирусы *Curtovirus* (подгруппа II), род бегомовирусы *Begomovirus* (подгруппа III) и род топокувирусы *Topocuvirus* (подгруппа IV).

#### Изменения в структуре семейства *Geminiviridae*

<u>Подгруппа</u>	<u>Роды:</u>	<u>Типовой вид</u>	<u>Геном</u>
Subgroup I	<i>Mastrevirus</i>	<i>Maize streak virus</i>	однокомп. – 4 гена
Subgroup II	<i>Curtovirus</i>	<i>Beet curly top virus</i>	-»- – 6 генов
Subgroup III	<i>Begomovirus</i>	<i>Bean golden mosaic virus</i>	двухкомп. – 6 генов
Subgroup IV	<i>Topocuvirus</i>	<i>Tomato pseudocurly top virus</i>	

Семейство лютеовириды *Luteoviridae*, вирусы которого не передаются механически, приобрело новый род полеровирусы *Polerovirus* на основе отличий в строении генома, в частности, за счет присутствия 5'-концевого VPg. Старый род энамовирусы *Enamovirus*, представленный одним вирусом, поменял название вида, который сейчас имеет новое обозначение – вирус деформирующей мозаики гороха 1 *Pea enation mosaic virus 1*. В результате тщательного анализа РНК-генома ранее представленного типичного представителя рода вируса деформирующей мозаики гороха было обнаружено, что характерная для него болезнь вызывается комплексом РНК 1 и РНК 2 вирусов, которые представляют геномы разных вирусов. Оказалось, что РНК 1 подобен полеровирусам, но у него отсутствует один полеровирусный белок, а образованный им капсид не может системно двигаться из клетки в клетку. Второй компонент прежнего типичного представителя рода с РНК 2 подобен умбравирусам, которые способны передвигаться из клетки в клетку, но не образуют в них частиц вирионов, так как не имеют гена КБ. Поэтому полеровирус деформирующей мозаики гороха 1 и умбравироз деформирующей мозаики гороха 2 были отнесены к разным родам; последний – к «плавающему» роду умбравирусов *Umbravirus* как представитель рода. Это яркий пример современного подхода к систематике вирусов в результате молекулярно-биологического анализа вирусного генома.

#### Структура семейства *Luteoviridae*

<u>Роды:</u>	<u>Типовой вид</u>
<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus -S''-VPg</i>
<i>Polerovirus</i>	<i>Potato leafroll virus</i> (из рода <i>Luteovirus</i> ) +5'-VPg
<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>

Структура семейства *Tombusviridae*

<u>Роды: (1995 г.)</u>	<u>(2000 г.)</u>	<u>Типовой вид</u>	<u>Отличия</u>
<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	5 ОРС, ОРС 3=СР
<i>Carmovirus</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>	5 ОРС, ОРС 5=СР
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	5 ОРС + сател. вируса
	<i>Machlomovirus</i>	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	ОРС, кеп, ОРС 4=СР
	<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>	2 мол. РНК
	<i>Avenavirus</i>	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>	4 ОРС, ОРС 3=СР
	<i>Aureusvirus</i>	<i>Pothos latent virus</i>	5 ОРС, ОРС 3=СР
	<i>Panicovirus</i>	<i>Panicum mosaic virus</i>	хелпер для сателлита вируса

В семействе бромовирида *Bromoviridae* выделен новый род *Oleavirus* с типовым представителем – латентный вирус маслины 2 *Olive latent virus 2*. Этот вирус имеет морфологию частиц, подобную вирусам рода альфамовирусов *Alfamovirus*, а также сходство в строении генома, субгеномную мРНК для СР (ген), но она не инкапсидируется и также имеет вирусную РНК4 с неизвестной функцией.

Структура семейства *Bromoviridae*

<u>Роды: (1995 г.)</u>	<u>(2000 г.)</u>	<u>Типовой вид</u>
<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
<i>Bromovirus</i>	<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>
<i>Ilarvirus</i>	<i>Ilarvirus</i>	<i>Tobacco streak virus</i>
<i>Alfamovirus</i>	<i>Alfamovirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
	<i>Oleavirus</i>	<i>Olive latent virus 2</i>

Значительные изменения произошли и с семейством *Potyviridae* – одним из самых многочисленных по количеству видов. В него включены несколько ранее предполагаемых вирусов семейства, с помощью которых сформированы новые роды, отличающиеся друг от друга по биологическим свойствам и некоторым особенностям в строении генома.

Структура семейства *Potyviridae*

<u>Роды: (1995 г.)</u>	<u>(2000 г.)</u>	<u>Типовой вид</u>	<u>Отличия (переносчики)</u>
<i>Potyvirus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>	тли
<i>Rymovirus</i>	<i>Rymovirus</i>	<i>Ryegrass mosaic virus</i>	клещи
<i>Bymovirus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	гриб
	<i>Macluravirus</i>	<i>Maclura mosaic virus</i>	тли
	<i>Ipomovirus</i>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	белокрылки
	<i>Tritimovirus</i>	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	клещи



Вирусы родов поти- и маклуравирусы передаются тлями (*Aphididae*) – непersistентно, когда вирусы не циркулируют в переносчике. Бимовирусы передаются грибом, чаще всего это полимикса злаков – *Polymyxa graminis*. Зооспоры гриба выполняют роль переносчика, поражая корни растений, и распространяют вирус через почву. В этот род входят главным образом вирусы, поражающие злаки: вирусы слабой мозаики ячменя, желтой мозаики ячменя и др. Римовирусы передают иксодовые клещи. Они проникают через почки и от растения к растению переносятся ветром. Ипомовирусы передаются белокрылками, поэтому чаще всего эти вирусы встречаются в жарких странах.

Ниже приводим характеристику родам вирусов растений, образованным в 2000 г. Во многих случаях, например, как это было ранее с «плавающими» родами, при более тщательном анализе уже известных и новых вирусов они не были включены в более крупные таксоны, допустим, семейства, но определились в самостоятельные роды. Итак, вновь образованные роды вирусов:

1. **онДНК-геномные:** род *Nanovirus* с типовым видом *Subterranean clover stunt virus* (20 ппн, 6–7 кольцевых ssДНК).

2. **днРНК-геномные:** род *Varicosavirus* с типовым видом *Lettuce bigvein virus* (палочковидные вирионы, два фрагмента днРНК, переносчик – гриб *Olpidium* sp.).

3. **он(-)РНК-геномные:** род *Ophiovirus* с типовым видом *Citrus psorovirus* (3 вида онРНК, не заражают злаковые).

Таким образом, для онДНК-геномных вирусов учрежден новый род нановирусы *Nanovirus* (греческое название *nanos* – карлик) с типовым вирусом карликовости подземного клевера *Subterranean clover stunt virus*. Он по размеру вириона и организации генома похож на цирковирусы *Circovirus* животных, поэтому прежде вирусы растений с такими характерными свойствами были включены в этот род, но так как они отличаются по размеру и морфологии вирионов, то это послужило основой для образования нового рода.

Род варикосавирусы *Varicosavirus* с типовым видом – вирусом разрастания жилок салата-латука *Lettuce bigvein virus* – назван по характерным симптомам на листьях (расширенные жилки). По морфологии вирионов, составу генома и биологическим свойствам вирус не похож на другие вирусы и был выделен в самостоятельный род.

Род офиовирусы *Ophiovirus* (*ophidian* – змеевидный) с типовым видом – вирусом псорозиса цитрусовых *Citrus psorosis virus* – включает вирусы с нитевидной морфологией, подобной tenuивирусам *Tenuivirus*, но в отличие от последних они имеют 3 фрагмента РНК (тенуивирусы – 4 фрагмента РНК) и не заражают злаковые растения.

Следующие вновь образованные роды – **он(+)-РНК-геномные**. Род *Furovirus* трансформирован, и из него выделили 3 рода:

– *Potomovirus* с типовым видом *Potato top-top virus* (3 молекулы РНК, тройной блок генов),

– *Pecluvirus* с типовым видом *Peanut clump virus* (2 молекулы РНК, тройной блок генов, переносчик – *Polymyxa graminis*),

– *Benyvirus* с типовым видом *Beet necrotic yellow virus* (2 молекулы РНК + дополнительный комплекс, переносчик – *Polymyxa beta*).

К другим новым родам отнесли:

- *Oourmiavirus* с типовым видом *Oourmia melon virus* (частицы квазисферические или бациллоподобные, 3 молекулы РНК).
- *Allexivirus* с типовым видом *Shallot virus X* (1 молекула РНК, 6 ОРС),
- *Foveavirus* с типовым видом *Apple stem pitting virus* (1 молекула РНК, 5 ОРС),
- *Vitivirus* с типовым видом *Grapevine virus*, выделен из рода триховирусы (1 молекула РНК, 5 ОРС, 4 ОРС=СР).
- *Umbravirus* с типовым видом *Carrot mottle virus* (нет гена СР (лютеовирусы) и вирионов, инфицирующих РНК в клетке).

Итак, род фуровирусы *Furovirus* (типовой вид – вирус мозаики пшеницы *Soil-borne wheat mosaic virus*, передающийся через почву). В результате очень тщательного анализа генома ранее включенных в него вирусов были выделены из этого рода три новых рода. Это род помовирусы *Pomovirus* с типовым вирусом метельчатости (щетковидности) верхушки картофеля *Potato mop-top virus*; вирусы этого рода имеют в геноме тройной блок генов (у фуровирусов его нет) и 3 молекулы РНК. Род пеклювирусы *Pechivirus*, который имеет типовой вид – вирус кустистости арахиса *Peanut clump virus* с двойным геномом, тройным блоком генов и переносчиком – почвенным грибом *Polymyxa graminis*. Род беньювирусы *Benyivirus* с типовым видом – вирусом некротического пожелтения жилок свеклы *Beet necrotic yellow vein virus*; он имеет 2 молекулы РНК и двучленный геном, передается с помощью переносчика *Polymyxa betae*.

Новый род оурмиавирусы *Oourmiavirus* с типовым видом – вирусом урмийской дыни *Oourmia melon virus* – включает вирусы с оригинальной морфологией вирионов, которые подобны вирионам альфамовирусов, но отличаются тем, что не имеют заостренных концов вирионов.

Новый род аллексивирусы *Allexivirus* представлен длинными нитевидными частицами вирусов (700 нм и более) с типовым видом – X-вирус лука-шалота *Shallot virus X*, виды этого рода имеют 6 ОРС и передаются клещами.

Вирусы нового рода фовеавирусы *Foveavirus* с типовым видом – вирусом ямчатости древесины яблони *Apple stem pitting virus* – имеют 5 ОРС и не имеют переносчика.

Новый род витивирусы *Vitivirus* с типовым видом – вирусом винограда А *Grapevine virus A* – выделен из рода триховирус *Trichovirus*, имеет 1 молекулу РНК, 5 ОРС, заражает только виноград, вызывая ямчатость и борозчатость древесины. Вирусы этого рода передаются мучнистыми червцами.

И, наконец, род умбравирусы *Umbravirus* с типовым видом – вирусом крапчатости моркови *Carrot motile virus*. В геноме вирусов этого рода нет гена СР, и они самостоятельно не образуют вирионов. В природе зависят от других специфических вирусов-помощников, в комплексе с которыми образуют вирионы за счет их белка. Этот случай напоминает ситуацию с знамовирусом деформирующей мозаики гороха 1, который вызывает симптомы деформирующей мозаики у тест-растений только при наличии умбравируса деформирующей мозаики гороха 2 и только тогда приобретает способность к передаче комплексной инфекции механически с помощью тлей.



В 2005 г в США (Danforth Plant Science Center, University of Missouri, State Louis) был опубликован VIII Доклад МКТВ «Таксономия вирусов», в котором вирусы были представлены 3 порядками, 73 семействами, 9 подсемействами и 287 родами, включающими 1938 видов. Доклад иллюстрирован 429 рисунками и диаграммами. Издательский коллектив М.А. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger и L.A. Ball во главе с С.М. Fauquet согласно этому Докладу представил новейшую таксономию вирусов растений на сегодняшний день (табл. 3). Среди вновь образованных трех семейств, представленных в табл. 3, только два семейства – *Geminiviridae* и *Nanoviridae* – включают вирусы с однонитевым ДНК-геномом, а *Caulimoviridae* – с двунитевым ДНК-геномом. Остальные вирусы растений являются РНК-геномными, причем большинство из них имеют однонитевую РНК положительного смысла – оНРНК(+).

Таблица 3

Таксономия вирусов растений (по материалам VIII Доклада МКТВ, 2005 г.)

Геном	Семейство	Род	Типовой вид
ssDNA	<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i> <i>Curlovirus</i> <i>Begomovirus</i> <i>Topocurus</i>	<i>Maize streak virus</i> <i>Beet curly top virus</i> <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> <i>Tomato pseudocurly top virus</i>
	<i>Nanoviridae</i>	<i>Nanovirus</i> <b><i>Babuvirus</i></b>	<i>Subterranean clover stunt virus</i> <i>Banana bunchy top virus</i>
DNA	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caulimovirus</i> <b><i>Soymovirus</i></b> <b><i>Cavemovirus</i></b> <b><i>Tungrovirus</i></b> <i>Badnavirus</i> <b><i>Petuvirus</i></b>	<i>Cauliflower mosaic virus</i> <i>Soybean chlorotic mottle virus</i> <i>Cassava vein mosaic virus</i> <i>Rice tungro bacilliform virus</i> <i>Commelina yellow mottle virus</i> <i>Petunia vein clearing virus</i>
dsRNA	<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i> <i>Phytoreovirus</i> <i>Oryzavirus</i>	<i>Fiji disease virus</i> <i>Wound tumor virus</i> <i>Rice ragged stunt virus</i>
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphacryptovirus</i> <i>Betacryptovirus</i>	<i>White clover cryptic virus 1</i> <i>White clover cryptic virus 2</i>
	Не определено	<b><i>Endornavirus</i></b>	<i>Vicia faba endornavirus</i>
RNA	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i> <i>Nucleorhabvirus</i>	<i>Lettuce necrotic yellow virus</i> <i>Potato yellow dwarf virus</i>
	Не определено	<i>Varicosavirus</i>	<i>Lettuce big-vein associated virus</i>
	-»-	<i>Ophiovirus</i>	<i>Citrus psorosis virus</i>
	<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i> <i>Tenuivirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> <i>Rice stripe virus</i>
	<i>Sequiviridae</i>	<i>Sequivirus</i> <i>Waikavirus</i> <b><i>Cheravirus</i></b>	<i>Parsnip yellow fleck virus</i> <i>Rice tungro spherical virus</i> <i>Cherry rasp leaf virus</i>
	<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i> <i>Fabavirus</i> <i>Nepovirus</i>	<i>Cowpea mosaic virus</i> <i>Broad bean wilt virus</i> <i>Tobacco ringspot virus</i>

Геном	Семейство	Род	Типовой вид
RNA	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>
		<i>Rymovirus</i>	<i>Ryegrass mosaic virus</i>
		<i>Bymovirus</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
		<i>Macluravirus</i>	<i>Maclura mosaic virus</i>
		<i>Ipomovirus</i>	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>
		<i>Tritimovirus</i>	<i>Wheat streak mosaic virus</i>
	Не определено	<i>Sobemovirus</i>	<i>Southern bean mosaic virus</i>
	<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>
		<i>Polerovirus</i>	<i>Potato leafroll virus</i>
		<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>
		<i>Umbravirus</i>	<i>Carrot mottle virus</i>
	<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tomato bushy stunt virus</i>
		<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus</i>
		<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
		<i>Dianthovirus</i>	<i>Carnation ringspot virus</i>
		<i>Machlomovirus</i>	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>
		<i>Avenavirus</i>	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>
		<i>Aureusvirus</i>	<i>Pothos latent virus</i>
		<i>Panicovirus</i>	<i>Panicum mosaic virus</i>
	Не определено	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>
		<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>
		<i>Hordeivirus</i>	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
		<i>Furovirus</i>	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>
		<i>Pomovirus</i>	<i>Potato mop-top virus</i>
		<i>Pecluvirus</i>	<i>Peanut clump virus</i>
		<i>Benyvirus</i>	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
	<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
<i>Ilarvirus</i>		<i>Tobacco streak virus</i>	
<i>Bromovirus</i>		<i>Brome mosaic virus</i>	
<i>Cucumovirus</i>		<i>Cucumber mosaic virus</i>	
<i>Oleavirus</i>		<i>Olive latent virus 2</i>	
Не определено	<i>Ourmiavirus</i>	<i>Ourmia melon virus</i>	
-)-	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	
<i>Tymoviridae</i>	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus</i>	
	<i>Tymovirus</i>	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	
	<i>Marafivirus</i>	<i>Maize rayado fino virus</i>	
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Beet yellow virus</i>	
	<i>Crinivirus</i>	<i>Lettuce infectious yellow virus</i>	
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	
<i>Flexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>	
	<i>Mandarivirus</i>	<i>Indian citrus ringspot virus</i>	
	<i>Allexivirus</i>	<i>Shallot virus X</i>	
	<i>Carlavirus</i>	<i>Carnation latent virus</i>	
	<i>Foveavirus</i>	<i>Apple stem pitting virus</i>	
	<i>Capillovirus</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>	
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i>	
	<i>Trichovirus</i>	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	

Примечание. Жирным шрифтом выделены вновь образованные таксоны.



Следует заметить, что при сравнении этой таксономии вирусов растений с предложенной ранее в 2000 г. (Van Regenmortel et al., 2000) кардинальных изменений не произошло, но существенные все-таки присутствуют. Например, появились новые виды из числа ранее не идентифицированных вирусов, которые пополнили роды и семейства. Кроме того, образовано три новых семейства – нановирида *Nanoviridae* с двумя родами – нановирусы *Nanovirus* (род дал название семейству) и бабивирусы *Babuvirus*; семейство тимовирида *Tymoviridae* с новым родом макулавиролы *Maculavirus* и известными родами тимовирусы *Tymovirus* и марафивирусы *Marafivirus* (ранее относили к «плавающим родам»), а также семейство флексивирида *Flexiviridae*, куда вошли известные и образованные в 2000 г. 8 «плавающих» родов. Семейство кластеровирида *Closteroviridae* пополнилось новым третьим родом ампеловирусы *Ampelovirus* с типовым вирусом – скручивающим листья винограда 3 *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Что касается семейства каулимовирида *Caulimoviridae*, то в нем роды остались те же, но они приобрели законченное название.

#### Структура семейства *Caulimoviridae* (обновленная)

<u>Роды: новое название</u>	<u>старое название</u>	<u>Типовой представитель</u>
<i>Caulimovirus</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
<i>Soymovirus</i>	« <i>SbCMV-like viruses</i> »	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>
<i>Cavemovirus</i>	« <i>CsCMV-like viruses</i> »	<i>Cassava vein mosaic virus</i>
<i>Petuvirus</i>	« <i>PVCV-like viruses</i> »	<i>Petunia vein clearing virus</i>
<i>Badnavirus</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Commelina yellow mottle virus</i>
<i>Tungrovirus</i>	« <i>RTBV-like viruses</i> »	<i>Rice tungo baciliform virus</i>

Образованы новые роды – эндорнавирусы *Endornavirus* (род пока не отнесен ни к одному из известных семейств) и черавирусы *Cheravirus* с типовым видом *Cherry rasp leaf virus*. Последний введен как третий новый род в семейство секвюивирида *Sequiviridae* наряду с родами секвюивирусами *Sequivirus* и вайкавирусами *Waikavirus*.

На сегодняшний день эта система классификации вирусов растений заняла лидирующее положение и вытеснила все другие. Уровень иерархии таксонов представляется хорошо обоснованным и устойчивым. Вид эквивалентен обиходному слову «вирус». Подобная систематика представляет большую ценность прежде всего потому, что вновь выявленный вирус, имеющий сходство с уже известными и включенными в этот список по таксономии, можно всего лишь по нескольким критериям отнести к определенному виду и, следовательно, к роду и даже семейству.

МКТВ как законодательный орган, рассматривая вопрос о номенклатуре вирусов растений, предложил называть в научной литературе вирусы их международными именами. В большинстве случаев они являются английскими названиями в отличие от латинских названий других биологических объектов. В неанглийской литературе во избежание недоразумений на международном уровне целесообразно, если не обя-

зательно, следует при первом названии вируса в тексте указывать его международное название согласно спискам вирусов в Докладах МКТВ. Кроме того, при написании международных названий таксонов (вирусов, родов, семейств и порядков) их следует писать с заглавной буквы курсивом либо простым шрифтом, но с подчеркиванием, как это принято писать при латинизированной номенклатуре биологических объектов. Название вирусов, еще не включенных в какой-либо вирусный род, так называемых предполагаемых (*tentative*) видов, предложено писать обычным шрифтом, но с большой буквы. Следует также придерживаться правильного написания сокращенных названий вирусов, т.е. аббревиатур, так как они утверждены МКТВ в качестве международных и являются уникальными для каждого вируса.

Известно, что особенностью всех живых организмов является то, что потомство может отличаться от родителей. Это относится и к вирусам растений. Образование измененных форм – важнейший этап эволюции вирусов. Вначале полагали, что вирусы – это стабильные системы, и каждую совокупность симптомов приписывали другому вирусу. Однако к началу 30-х годов прошлого столетия для вирусов растений выяснились важные обстоятельства: 1) вирусы могут существовать в виде различных штаммов, способных вызывать различные симптомы у одного и того же растения-хозяина; 2) разные вирусы могут вызывать сходные симптомы у одного и того же растения-хозяина; 3) некоторые болезни могут быть вызваны присутствием сразу двух неродственных вирусов. Поэтому были введены понятия, более низкие по иерархическому уровню вируса, – **штамм** (*strain*) и **изолят** (*isolate*), которые являются показателем видового разнообразия многих вирусов растений. Под изолятом вируса понимают индивидуальную однородную популяцию вируса, выделенную из какого-либо источника и получаемую в результате клонирования путем серии пассажей через подходящее индикаторное растение. Процесс идентификации начинается с изучения и описания свойств отдельных изолятов вируса, которые сравнивают и по свойствам относят к определенному виду. Чем больше число изолятов вируса подвергается изучению, тем более обширная информация используется в качестве основы для таксономии, тем больше вероятность построения более полезной классификационной системы. Вирусные изоляты, не отличающиеся по своим свойствам, относятся к одному **штамму вируса**, чаще всего типичному, или обычному (*vulgaris*). В результате мутаций штаммы вируса могут отличаться по аминокислотному составу, электрофоретической подвижности и антигенным свойствам структурных белков, а также по стабильности вирионов в условиях *in vivo* или *in vitro*, по эффективности передачи с помощью переносчиков и по специфичности в отношении круга поражаемых растений. Долгие годы считали, да и сейчас это трудно оспорить, что биологические свойства являются наиболее характерными и стабильными признаками при идентификации не только вируса, но и его штамма.

Таким образом, штамм как таксономическая категория отражает существенное внутривидовое разнообразие вируса. Например, для ВОМ по этому критерию известно более 50 штаммов, и открываются все новые. Как показали наши многолетние исследования в ДФО, изменчивость вирусов растений, особенно входящих в роды то-



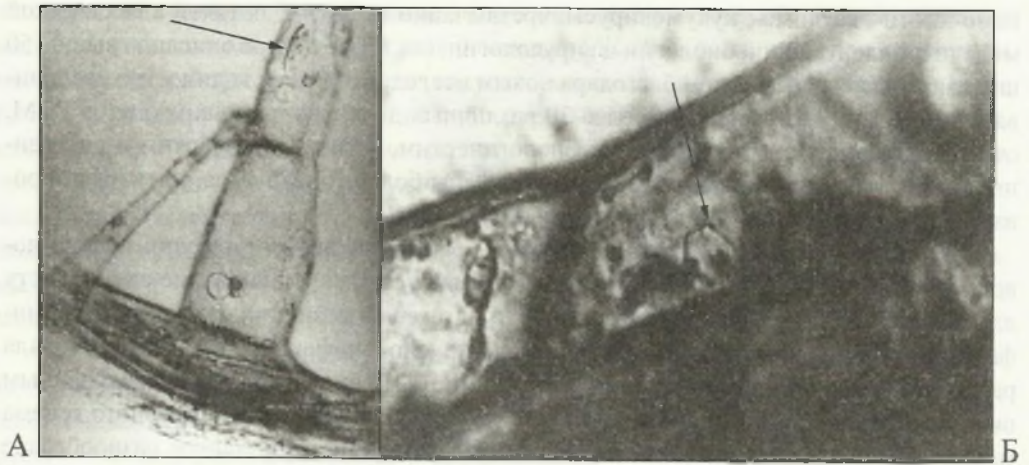
бамо-, поти-, каулимо-, кукумовирусы, чрезвычайно высока. Для такой классической модели в молекулярной биологии и вирусологии, как ВТМ, в мире описано свыше 350 штаммов. И с каждым годом благодаря новым исследованиям их количество увеличивается. Только нами выявлено более 20 различных дальневосточных изолятов ВТМ, отличающихся главным образом по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам (для сравнения были привлечены более 10 штаммов, идентифицированных ранее на территории бывшего СССР).

В прошлом столетии термин «штамм» в научной литературе упоминался довольно часто. Работа с конкретным штаммом вируса давала основание специалисту для более фундаментального изучения роли патогена в возникновении вирусной инфекции и механизмов защиты растения от вирусной инфекции, а также позволяла разработать практические варианты борьбы уже не с вирусом, а его определенным штаммом. В настоящее время в связи с основательным изучением вирусного генома многие фитовирусологи понятие штамм не выделяют, а внутривидовое разнообразие вируса сводят к понятию изолят. Но так как результаты, представленные в монографии, получены в то время, когда термин «штамм» употреблялся довольно часто, характеризуя разнообразие отдельного вида, мы в некоторых случаях будем упоминать этот таксон. При этом мы руководствовались принятыми в фитовирусологии понятиями, что существует два основных типа критериев для идентификации штаммов. Первый – это структурные критерии, основанные на свойствах вирусной частицы. Второй – биологические критерии, основанные на характеристике взаимоотношений вируса с растением-хозяином и переносчиком.

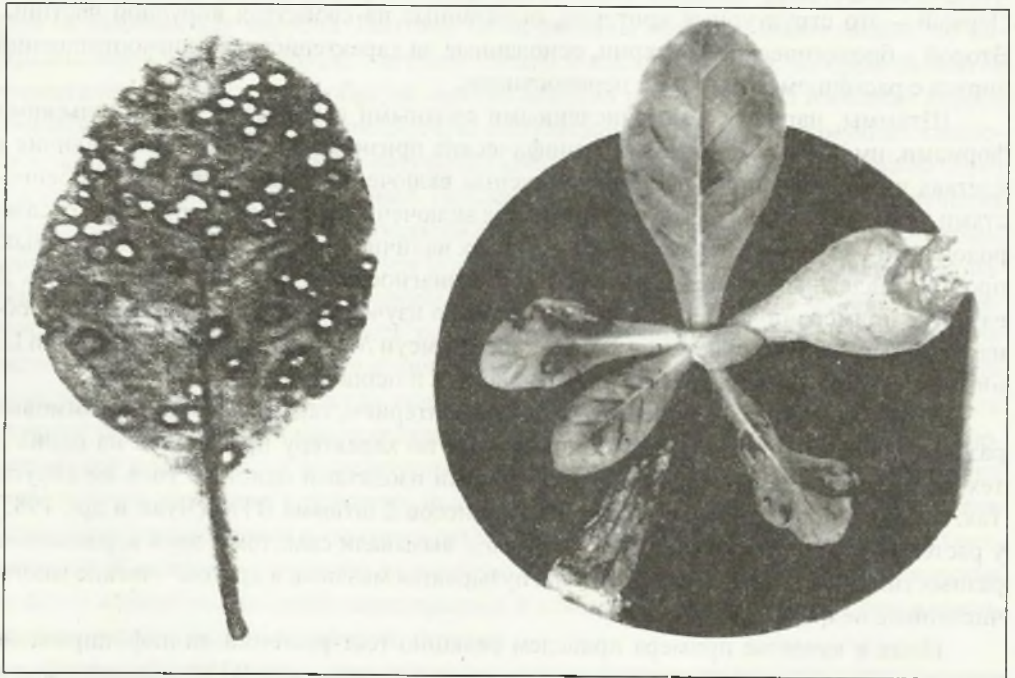
Штаммы, наряду с многочисленными сходными свойствами с родительскими формами, имеют новые, штаммоспецифические признаки. К ним относят наличие в клетках инфицированных растений вирусных включений с характерными особенностями для определенного штамма. Вирусные включения образуются обычно вирусами родов поти-, тобамо-, каулимовирусы и др. Их наличие в клетке – довольно быстрый, простой, надежный и специфический метод диагностики вируса и его штаммов. В качестве примера приведем наши результаты по изучению вирусных включений, обнаруженных в клетках растений табака сорта Самсун *Nicotiana tabacum* cv. Samsun L., инфицированного изолятами ВТМ из баклажана и перца (рис. 1).

При этом всегда считалось, что важным критерием, гарантирующим штаммовые различия, являются симптомы, отличающиеся по характеру проявления на одних и тех же растениях после заражения различными изолятами одного и того же вируса. Так, идентифицированные из растений нарциссов 2 штамма ВТМ (Чуян и др., 1985) у растений табака лесного *Nicotiana sylvestris* вызывали симптомы двух кардинально разных типов – в одном случае это была пузырчатая мозаика, в другом – четкие многочисленные некрозы (рис. 2).

Ниже в качестве примера приведем реакцию тест-растений на инфицирование одних и тех же растений тремя дальневосточными изолятами ВТМ, выявленными в Приморском крае на растениях овощных культур – томате, перце и баклажане (табл. 4). Оказалось, что при заражении определенным изолятом ВТМ симптомы у отдельных видов растений проявлялись избирательно.



*Рис. 1.* Вирусные включения ВТМ (показаны стрелками). Изолят ВТМ из баклажана (А) и из перца (Б) с мозаичными симптомами



*Рис. 2.* Многочисленные некрозы (слева) и пузырчатая мозаика (справа) на листьях табака лесного после инокуляции изолятами ВТМ, выявленными на нарциссах



Реакция тест-растений на заражение различными изолятами ВТМ

Семейство, вид и сорт растения	Изоляты ВТМ		
	Томат	Перец	Баклажан
<b>Amaranthaceae Juss.</b>			
<i>Amaranthus caudatus</i> L.	—	—	—
<i>Am. hybridus</i> L.	—	—	—
<i>Gomphrena decumbens</i> L.	—	—	—
<i>G. globosa</i> L.	L: N	L: N	L: N
<b>Chenopodiaceae Vent.</b>			
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	L: N L: NR	L: NSp L: NR	L: N L: NR
<i>Ch. ambrosoides</i> L.	—	—	—
<i>Ch. bonus henricus</i> L.	—	—	—
<i>Ch. capitatum</i> L.	L: NSp	L: NSp	L: NSp
<i>Ch. murale</i> L.	L: N	L: NSp	L: NSp
<i>Ch. quinoa</i> Willd.			
<b>Scrophulariaceae Juss.</b>			
<i>Antirrhinum majus</i> L.	—	S: O	—
<b>Solanaceae Juss.</b>			
<i>Capsicum annuum</i> L.	L: N; S: CIMot	L: NR, S: M	L: NVe; S: O
<i>C. baccatum</i> L.	S: M, Dis	S: M, Dis	S: M, Dis
<i>Datura ferox</i> L.	L: N	L: N	L: N
<i>D. meteloides</i> Dun.	L: N	L: N	L: N
<i>D. stramonium</i> L.	L: NR	L: NR	L: NR
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., сорта: Невский	S: M, Dis	S: M, Dis	S: M, Dis
Новичок	S: M, Dis	S: M, Cl	S: M, Dis
Хабаровский	S: M, Dis	S: Cl, Dis	S: M, Dis
<i>L. pimpinellifolium</i> Mill.	S: O	S: O	S: O
<i>Nicandra physaloides</i> (L.) Gaerth.	L: NR	L: NR	L: NR
<i>Nicotiana alata</i> Linket Otto	L: NR	S: Dis, Cl	L: NR
<i>N. longiflora</i> L.	—	—	—
<i>N. rustica</i> L.	L: N; S: O	L: N; S: Dis, Cl	L: N; S: O
<i>N. sandera</i> Wats.	L: N; S: O	L: N	L: N
<i>N. sylvestris</i> Speg et Comes	S: M, Dis	S: M, Dis	
<i>N. tabacum</i> L., сорта: Samsun	S: ClSpM	S: ClM	S: M, Dis S: ClM
Xanthi	L: N	L: N	L: N
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	L: N; S: O	L: N; S: O	L: N; S: O
<i>Solanum dulcamara</i> L.	—	—	—
<i>S. melongena</i> L.	—	L: NSp	L: NSp
<i>S. nigrum</i> L.	S: O	S: MCl	S: MCl

Биологические свойства вирусов и их штаммов коррелируются с инфекционностью вирусной н.к. и влияют на устойчивость вирусов в соке инфицированных растений. На раннем этапе изучения вирусов растений еще Ф. Боуден (1952) отметил, что у каждого вируса своя точка термической инактивации (ТТИ). До сих пор этот индивидуальный критерий учитывается исследователями не только при идентификации вирусов, но и их штаммов (табл. 5).

Таблица 5

Сравнительная характеристика физических свойств  
некоторых дальневосточных изолятов ВТМ

Изоляты ВТМ из:	ТТИ, °С	ПСИ	ПРС
перца (мозаичный)	90	более 2 мес.	$10^{-12}$
ириса	80	-»-	$10^{-11}$
томата	90	-»-	$10^{-11}$
баклажана	85	-»-	$10^{-12}$
перца (некротический)	95	-»-	-
обычный штамм (по: Brunt, 1977)	90	более 4 мес.	$10^{-10}$

Наши многолетние исследования по изучению физических свойств вирионов свидетельствуют, что для большинства дальневосточных изолятов вирусов характерна более низкая ТТИ, чем для этих же вирусов из всех известных по литературным данным в других географических регионах. Так, выявлена довольно низкая ТТИ для дальневосточного изолята ВТМ, обнаруженного на ирисе – 80 °С (Толкач, 1995), такой показатель ТТИ имел только казахский штамм (Гольдин, Вострова, 1963).

Кроме того, нами отмечено, что конкретный дальневосточный изолят вируса обычно передается в природе только одним типом переносчика, что служит устойчивым признаком для отнесения его к определенному роду. Безусловно, способ передачи вируса (не только насекомыми) с больного на здоровое растение – один из важных критериев идентификации.

Моноштаммовые антисыворотки почти всегда имели различные титры специфических антител, и, как правило, капсидные белки штаммов одного вида четко различались по иммуногенной и антигенной активности. При этом надо помнить, что титр штаммоспецифических антител зависит как от способа получения антисывороток, так и реактивности (индивидуальности) животного. Весьма примечательно, что у антигенно родственных штаммов вируса оказываются сходными и другие признаки, например морфология вирусных частиц, тип переносчика, м.м. структурных белков, растения-хозяева и т.д. Таким образом, антигенная специфичность капсидных белков большинства штаммов и изолятов вирусов представляет собой сравнительно стабильный признак при идентификации. Родственные вирусы, отличающиеся по антигенной специфичности и авидности, получили название **серотипов** (необходимо иметь в виду, что в вирусологии человека и животных этот термин имеет другое значение).

К настоящему времени накоплена обширная информация о штаммах вирусов и факторах, влияющих на процессы их образования и распространения. Например,



стало известно, что степень распространения на злаках по годам, в том числе и доминирующих штаммов вируса желтой карликовости ячменя (ВЖКЯ), различна. Причем штамм RA V ВЖКЯ обычно присутствовал в качестве одного из компонентов при смешанных инфекциях, и наиболее высокий процент передачи инфекции тлями наблюдался при наличии в инокулюме более одного штамма этого вируса. Сравнительный анализ штаммов ВЖКЯ из различных географических мест показал их отличия по антигенным свойствам, в строении генома, в особенностях взаимодействия между белками вирионов, в специфичности и вирофорности переносчика. Правда, считается, что векторный фенотип штаммов ВЖКЯ не может быть полностью охарактеризован из-за большого количества его потенциальных векторов. К настоящему времени выявлено 98 видов тлей – переносчиков ВЖКЯ, из них 13 видов являются общими для зерновых культур (овса, пшеницы, ячменя и кукурузы). Подобные различия в переносе штаммов вирусов растений отмечены и для нематод. Так, штамм вируса погрешности табака, изолированный из растений табака, обычно распространяется нематодами вида *Trichodorus similes*, в то время как другие штаммы – *T. primitivus*, *T. cylindricus*, *T. viruliferus* (Келдыш, Помазков, 2003).

Следовательно, возникающие в результате изменчивости вирусов растений генетические варианты обладают одинаковой морфологией и биохимическим составом, но различаются по структуре белков и вследствие этого по вирулентности, антигенным свойствам, электрофоретической подвижности белков, отношением к температурному фактору (ТТИ), по кругу растений-хозяев и виду переносчика. Поэтому, вероятнее всего, они смогли бы занять законное место как самый низкий таксон в универсальной систематике вирусов растений.

Итак, нами дана краткая характеристика семейств и родов вирусов растений утвержденных МКТВ главным образом после Международного Конгресса по вирусологии в Иерусалиме в 1996 г. и решениями Исполнительного комитета МКТВ в 1987 и 1998 г., а также после публикаций VII (Van Regenmortel, et al., 2000) и VIII (Fauquet et al., 2005) Докладов МКТВ. К настоящему времени накопилось много данных по фенотипическим и генетическим вариантам вирусов, которые требуют глубокого анализа видовой изменчивости, присущей многим вирусам растений. Надо предполагать, что в таксономии вирусов растений в ближайшем будущем должны произойти значительные изменения, так как к настоящему времени все таксономические структуры основываются на неполной информации в основном генома вируса. Кроме того, пока еще сотни вирусов не классифицированы в связи с отсутствием необходимых сведений о их свойствах. Поэтому по мере поступления новых данных неизбежно будет происходить совершенствование и изменение в таксономии и номенклатуре вирусов растений.

## Семейство Caulimoviridae

Согласно последнему VIII Докладу МКТВ все двухцепочечные ДНК-содержащие вирусы растений объединяются в одно семейство каулимовирида *Caulimoviridae*, в которое наряду с родом *Caulimovirus* включают еще пять (Fauquet et al., 2005) с общей численностью видов около 30 (табл. 6). В 70-е годы было выделено только два рода – *Caulimovirus* и *Badnavirus* (Wildy, 1971)

Таблица 6

Характеристика родов семейства *Caulimoviridae*

Род	Морфология вириона	Размер вириона, нм	Размер генома, п.н.	Количество ОРС
<i>Caulimovirus</i>	Сферическая	50	~8013	8
<i>SbCMV-like-viruses</i>	- « -	~50	8175	7
<i>CsVMV-like-viruses</i>	- « -	~50	8158	5
<i>PVCV-like-viruses</i>	- « -	~50	7205	2
<i>Badnavirus</i>	Бациллоподобная	130	7500–8000	3
<i>RTBV-like-viruses</i>	- « -	110–400	8000	4

### Структура семейства *Caulimoviridae*

Роды:	Типовой представитель:
<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
<i>Soymovirus</i>	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>
<i>Cavemovirus</i>	<i>Cassava vein mosaic virus</i>
<i>Petuvirus</i>	<i>Petunia vein clearing virus</i>
<i>Badnavirus</i>	<i>Commelina yellow mottle virus</i>
<i>Tungrovirus</i>	<i>Rice tungo bacilliform virus</i>

Названия семейства каулимовирида *Caulimoviridae* и рода *Caulimovirus* образованы от названия типового представителя рода – *Cauliflower mosaic virus*, название рода *Badnavirus* – от слова *bacilliform* – бациллоподобная форма вириона плюс *dna* от *deoxyribonucleic acid* (DNA) – тип генома. Другие роды обозначены сокращенными названиями типовых представителей родов: *Soybean chlorotic mottle virus*, *Cassava vein mosaic virus*, *Petunia vein clearing virus*, *Commelina yellow mottle virus* и *Rice tungo bacilliform virus*.

Все вирусы семейства *Caulimoviridae* являются обратно транскрибирующими (Mesnard, Carriere, 1995). В основе их группирования главным образом лежит особенность структуры геномов (размер, расположение и количество ОРС) и их репликации



(Hull, Covey, 1987). Как следует из табл. 6, род *Badnavirus* и выделенный в 1997 г. из их состава в отдельный род «*RTBV-like viruses*» (ныне род *Tungrovirus*) отличаются по морфологии частиц и не формируют цитоплазматических включений.

Большинство видов семейства были описаны лишь в последние два десятилетия. МКТВ до 2005 г. из-за отсутствия полных сведений о структуре и особенностях функционирования их геномов, белковом составе и т.д. не включал многие новые виды в данное семейство. Так как в ДФО идентифицировано два вируса этого семейства из рода *Caulimovirus*, то мы дадим краткую характеристику именно этому роду.

### Род *Caulimovirus*

Род каулимовирусов немногочислен и включает 9 видов и 4 его возможных члена. Типовой представитель рода *Caulimovirus* – вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК) *Cauliflower mosaic virus* наиболее изучен среди каулимовирусов, и поэтому многие характеристики рода будут даны на примере этого вируса.

**Свойства вирионов.** Вирионы каулимовирусов – изометрические частицы с диаметром около 50 нм, с многослойной структурой, без оболочки. Вирион ВМЦК имеет сферическую форму диаметром  $50,3 \pm 1,4$  нм (Kruse et al., 1987). Структура вириона многослойная – триангуляционное число (Т) – 7: 420 субъединиц весом около 40 кДа (Hull, Sepherd, 1976; Cheng et al., 1992). Оболочка отсутствует, м.м. вириона около 20 мДа.

**Физико-химические свойства.** Коэффициент диффузии (D) –  $\sim 0,75 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$ ; истинный парциальный специфический объем –  $\sim 0,704$ ; частицы стабильны, плавучая плотность в хлористом цезии –  $\sim 1,37 \text{ г/см}^3$  (Hull et al., 1976). Очищенный препарат ВМЦК осаждается в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,2, единым компонентом с коэффициентом седиментации ( $S_{20,w}$ )  $208 \pm 1,1 \text{ S}$  (Hull, Sepherd, 1976). В 1990 г. удалось получить ВМЦК в кристаллическом виде (Gong et al., 1990).

Одна молекула днднк в форме открытого кольца с одонитевыми разрывами в специфических сайтах, транскрибируемая ( $\alpha$ )альфа нить с одним разрывом, а не-транскрибируемая ( $\beta$ )бета с двумя разрывами. ДНК нескольких изолятов секвенирована. Физико-химическая характеристика препарата, при которой вирус сохраняет инфекционность: отношение длин УФ поглощения  $A_{260/280} = 1,85$ ;  $A_{\text{max/min}} = 2$  (Shepherd et al., 1968). Коэффициент экстинкции (КЭ) составляет 4,36 (Shepherd, 1970).

Изоэлектрическая точка вируса в зависимости от штамма варьируется в пределах pH 3,5–5,0. Вирионы также преципитируют в присутствии ионов магния. Это происходит при низкой ионной силе 0,01М калий-фосфатного буфера, pH 7,1, в присутствии 0,05 М  $\text{Mg}^{2+}$  (Shepherd, Wakeman, 1971).

**Капсидные белки** транслируются с ОРС IV и собираются в капсид как фосфорилированные полипептиды 57 кДа, причем экспериментально индуцированные мутации в участках фосфорилирования делают вирус неспособным к инфицированию клеток хозяина (Chapdelaine et al., 2002).

До настоящего времени остается не выясненным белковый состав вирионов ВМЦК. С помощью электрофореза в денатурирующих условиях в свежеполученных препаратах вируса выявляют до 10 белковых зон, однако реально только 2–3 из них являются структурными белками, остальные – агрегаты или продукты деградации структурных белков (Tezuka, Taniguchi, 1972). Изучая протеолиз вирионных белков ВМЦК *in vitro*, другие японские исследователи (Hahn, Shepherd, 1982) обнаружили, что содержание белка с м.м. 44 кДа при хранении препарата в течение 48 ч при комнатной температуре снижается с 40 до 10%, в то время как содержание белка с м.м. 37 кДа увеличивается с 60 до 90%. Белок с м.м. 67 кДа, возможно, образуется в результате агрегации белка 34 кДа, так как при повторном электрофорезе белка из зоны 34 кДа в отсутствие 2 меркаптоэтанола появляется новый компонент – белок 67 кДа. Последние авторы модифицировали методику очистки, предложенную Р. Халлом с соавт. (Hull et al., 1976). Они получили препарат вируса в течение одного дня, при этом гомогенизировали материал в большом количестве буфера (отношение материал: буфер – 1:5). Полученный препарат немедленно подвергали электрофорезу в агарозе. Выявлены две белковые зоны. Экстрагированные белки были денатурированы и подвергнуты электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ). Один из компонентов распадался на белки 58 и 44 кДа, другой – на белок 37 кДа и его димер 67 кДа. Три электрофоретические формы вирионов ВМЦК также описал Mesnard с соавт. (1993). Результаты экспериментов позволили исследователям сделать предположение, что в растении накапливаются вирионы с различным составом белков. Структурными являлись только 2–3 из шести кодируемых вирусным геномом белков.

**Организация генома и репликация.** ВМЦК был первым вирусом растений, для которого было доказано, что его геном представлен ДНК с м.м. 4,5–5,0 мДа (Shepherd et al., 1968), соответствующим длине около 8 т.п.о. (Balazs et al., 1982). Вирион содержит одну молекулу ДНК, состоящую из двух комплементарных цепей в форме открытого кольца (Shepherd et al., 1970). Содержание ДНК в частице – 15,9% (Hull et al., 1976). После выделения геномная ДНК была неоднородна и состояла из смеси кольцевых молекул с разной степенью «скрученности» и линейных молекул (Menissier et al., 1983). Инфекционностью обладали только кольцевые формы ДНК (Russel et al., 1971; Lebeurier et al., 1980).

Геном ВМЦК содержит одноцепочечные сайтспецифические разрывы ( $S_1$ -сайты), впервые обнаруженные Volovich с соавт. (1978), количество которых зависит от штамма ВМЦК. Чаще всего  $S_1$ -сайтов три (Menissier et al., 1985).

ДНК вируса имеет 6 больших и 2 малые открытые рамки считывания (ОРС), которые следуют одна за другой и очень мало перекрываются. Исключение составляет ОРС VIII, локализующаяся внутри ОРС IV (Franck et al., 1980; Balazs et al., 1982). *In vivo* белковые продукты (P1–P6) были определены для генов с I по VI, белки экспрессируемые ОРС VII–VIII, не идентифицированы (Maule et al., 1989).

Ген I кодирует белок с м.м. 40 кДа (P1), необходимый для распространения вируса по растению (Thomas et al., 1993; Ducasse et al., 1995). Белок модифицирует плазмодесмы посредством образования тубул, через которые могут перемещаться вирусные частицы (Thomas, Maule, 1995). Установлено высокое родство P1 к РНК и одноцепочеч-



чечным ДНК. Предполагается, что Р1 способен образовывать комплекс с 35S РНК и транспортироваться из клетки в клетку (Citovsky et al., 1991). При сравнении нуклеотидных последовательностей данного участка ДНК различных штаммов было установлено, что степень консервативности ОРС I очень высока (Chenault, Melcher, 1994). Белок Р1 обнаружен во включениях (Young et al., 1987; Martinez-Izquierdo et al., 1987), фракциях клеточной стенки и полисомах (Albrecht et al., 1988).

Ген II обеспечивает синтез белка с м.м. 18 кДа (Р18), являющегося фактором передачи вируса тлями (Mesnard, Carriere, 1995). Предполагается, что Р18 способен связываться с рецепторами на поверхности вирусных частиц и с соответствующими рецепторами стилета переносчика, формируя обратимый белковый комплекс, за счет которого вирионы удерживаются на стилете насекомого и сохраняют инфекционность в течение нескольких дней (Schmidt et al., 1994; Pirone, Blanc, 1996).

Взаимодействуя с белком Р6, являющимся транскрипционным трансактиватором, Р2 способен оказывать влияние на транскрипционную активность «поздних» вирусных генов, тем самым изменяя ход вирусной инфекции (Qiu et al., 1997).

Ген III – единственная открытая рамка считывания, функциональная роль белкового продукта которой до конца не ясна, но не вызывает сомнения участие данного белка в инфекционном цикле. Полипептид Р15 имел м.м. 15 кДа, изучена его конформация, позволяющая ему связываться с ДНК, с вирускодируемой обратной транскриптазой (RT), и установлена его локализация в вирусной частице (Giband et al., 1986). Р15 обнаруживался в составе вирионов (Dautel et al., 1994), и возможно, он был задействован в процессах репликации вирусной ДНК, а также сборке частиц (Maule et al., 1989).

Позже было высказано предположение, что Р15 является белком-гистоном и принимает участие в стабилизации вирусной ДНК после обратной транскрипции (Mougeot et al., 1993; Mesnard, Carriere, 1995).

Последние исследования показали, что Р15 у штаммов ВМЦК, передающийся тлями, способен связываться с Р18 и белком капсидной оболочки вируса (Leclerc et al., 1999), поэтому штаммы вируса, содержащие Р18 в достаточном количестве, но имеющие делецию в ОРС III, теряли способность к передаче тлями (Leh et al., 1999). В инфицированных ВМЦК клетках вирусные компоненты, ответственные за передачу вируса тлями, равномерно распределены в цитоплазме. После проникновения стилета и впрыскивания слюны, тля всасывает часть клеточного содержимого вместе с включениями вируса. После этого в стилете комплекс РII:РIII:вирионы диссоциирует. Фактор РIII теряется, а вирионы с помощью РII удерживаются на кутикуле стилета до прокола следующей клетки (Drucker et al., 2002). Таким образом, Р15 рассматривается как второй фактор передачи ВМЦК тлями.

ОРС 3 связана с ОРС 2 и частично перекрывается с ОРС 4 и в целом имеет двухдоменную организацию (Jacquot et al., 1998).

Ген IV транскрибируется с образованием полицистронного белка м.м. 57 кДа (Р4), последующий процессинг приводит к формированию двух белков оболочки – 42 и 37 кДа (Brunt, Barton, 1975). Как и многие другие вирускодируемые белки Р4 многофункционален. С-участок аминокислотной последовательности (между 77 и 332 ами-

нокислотами) ответственен за агрегацию капсидных белков. Также выявлен участок Р4, ответственный за его неспецифическое связывание с нуклеиновыми кислотами (Chapdelaine, Hohn, 1998). N-концевой участок Р4 содержит N-концевой ядерный сигнал (NLS), который в сформированном вирионе расположен на его поверхности и доступен для взаимодействия с NLS-рецепторами ядерной оболочки (Leclerc et al., 1999). С помощью такого высокоспецифичного узнавания регулируется поступление вирусных белков и вирионов в ядро клетки хозяина (Karsies et al., 2002). Таким образом, белки оболочки являются не только защитной структурой вириона, но также играют важную роль на начальных стадиях репликативного цикла ВМЦК, обеспечивая проникновение частицы в ядро клетки растения-хозяина, а на заключительных – обеспечивая самосборку.

Ген V – наиболее сложно организован. В нем идентифицировано три функциональных домена: PR отвечает за синтез аспарагиновой протеиназы (А-протеиназы), обратной транскриптазы, Н-РНКаза. Перечисленные белки формируются как полицистронный белок, который в ходе процессинга распадается на три функциональных белка. А-протеиназа участвует в процессинге сложного белка с м.м. 57 кДа, формируя белки капсида. РНКаза гидролизует ядерные комплексы ДНК–РНК. Обратная транскриптаза осуществляет синтез вирусных ДНК на матрицах РНК. Для инициации обратной транскрипции в качестве затравки используется одна из транспортных РНК хозяина (<sup>3</sup>РНКmet) (Mesnard, Carriere, 1995).

Ген VI кодирует белок вирусных включений (Р6), который играет важную роль в инфекционном цикле вируса (Odell et al., 1981; Covey, Hull, 1981). Р6 контролирует синтез других белков ВМЦК за счет их трансактивации в ходе процессинга полицистронной 35S РНК (Kobayashi et al., 1998).

Выделенный из состава вирусной ДНК и перенесенный в растения, не являющиеся природными хозяевами для ВМЦК, ген VI вызывал появление вирусспецифических симптомов (Vaughman et al., 1988; Zijlsra et al., 1996). Помимо этого, оказалось, что вирус способен определять специфичность изолята по отношению к кругу поражаемых тест-растений (Schoelz et al., 1986). Он также влияет на развитие симптомов штаммоспецифичных инфекций (Goldberg et al., 1991; Broglio, 1995; Kiraly et al., 1999; Geri et al., 1999) и на ответную реакцию тест-растения, названную реакцией гиперчувствительности (Palanichelvan, Schoelz, 2002). Более подробно функции ОРС VI будут рассмотрены в разделе, посвященном репликации вируса. В целом ген VI наряду с геном V является ключевой детерминантой успешного осуществления жизненного цикла вируса.

Помимо кодирующих областей генома ВМЦК, в нем обнаружены три не кодирующих белки участка, названные межгенными областями (Balazs et al., 1982) (табл. 7).

Репликация вируса достаточно хорошо изучена и начинается с проникновения вириона в цитоплазму клетки хозяина. Освободившаяся из вириона вирусная нуклеиновая кислота, а для ВМЦК – суперспиральная ДНК, перемещается в ядро и соединяется с хозяйскими белками-гистонами, образуя мини-хромосому. Хозяйская РНК-полимераза II транскрибирует данную структуру, в результате чего в цитоплаз-



му поступают четыре вирусных РНК-транскрипта, основные из которых 35S и 19S РНК (Olszewski et al., 1982).

Синтез 19S РНК начинается в малой межгенной области между ОРС V и VI (с позиции 5765), а заканчивается в большой межгенной области недалеко от S1 разрыва а-цепи (позиция 7615) и транслируется в белок Р6, образующий вирусные включения в цитоплазме (Covey, Hull, 1981). 35S РНК начинает синтезироваться в большой межгенной области (позиция 7435), а заканчивается в позиции 7615 – продукт транскрипции всего вирусного генома, имеющего терминальную избыточность 180 нуклеотидов (Rothnie et al., 1994).

Образующийся белок Р6, взаимодействуя с белками клетки растения-хозяина, участвующими в трансляции, функционирует как трансляционный трансактиватор, изменяющий трансляционный механизм инфицированной клетки (Leh et al., 2000; Palanichelvan, Schoelz, 2002). Однако этого еще не достаточно для запуска биосинтеза вирусных белков с 35S РНК. Оказалось, что в образующихся в ходе транскрипции 35S РНК содержатся фрагменты, сходные с таковыми у эукариотических организмов, называемые интронами, которые должны быть удалены до начала трансляции (Kiss-Laszlo et al., 1995).

Сайт инициации трансляции находится на 5'-конце 35S РНК. Ему предшествует регуляторный фрагмент (РФ) длиной 600 п.н., контролирующей важнейшие функции в жизненном цикле вируса: полиадезинирование, сплайсинг, инициацию обратной транскрипции, сборку вирионов и трансляцию. РФ содержит несколько небольших ОРС, ингибирующих трансляцию, за счет образования петель (stem-loop structure) (Rooggin, 1999). Негативный эффект РФ на трансляцию вирусных белков снимается за счет функционирования, несвойственного для механизма трансляции про- и эукариот, называемого рибосомальным шунтом, молекулярный механизм которого до конца не выяснен (Futterer et al., 1990; Futterer et al., 1993).

Трансляция 35S транскрипта приводит к образованию полицистронного белка (Marsh, Kuzj., 1985), из которого в ходе посттрансляционного процессинга (с участием А-протеиназы) образуются вирусные белки (Torruella et al., 1989).

35S РНК содержит полную генетическую информацию вируса и подвергается в цитоплазме обратной транскрипции (во включениях) с образованием открытых кольцевых вирусных ДНК (Pfeiffer, Hohn, 1983). Последние транспортируются в ядро, где в ходе репарационных перестроек снова образуются суперскрученные ДНК вируса (Olszewski, Guileoyle, 1983). Таким образом, 35S РНК является матрицей для синтеза

Таблица 7

**Локализация кодирующих и некодирующих областей на физической карте ВМЦК (по: Balazs et al., 1982)**

Область генома	Локализация, п.н.
ОРС I	365–1348
ОРС II	1345–1824
ОРС III	1826–2215
ОРС IV	2197–3669
ОРС V	3623–5650
ОРС VI	5754–7322
Короткая межгенная область	5651–5753
Длинная межгенная область 1	7323–8016
Длинная межгенная область 2	1–364
ОРС VII	13–303
ОРС VIII	3260–3583

геномной ДНК, а также выступает в роли мРНК, с которой транслируются многие вирусные белки. Они из цитоплазмы поступают в цитоплазматические включения, где осуществляется сборка вирионов (Himmelbach et al., 1996).

Таким образом, несмотря на то что вирус является ДНК-геномным, в основе его репликации лежит механизм обратной транскрипции, который еще 10–15 лет назад считался характерным только для ретровирусов. Однако в настоящее время он показан уже и для двух других родов (гепадна- и каулимовирусов). Данное обстоятельство, а также сходство в организации геномов, объединяют эти роды под общим названием параретровирусы (Scholthof et al., 1993; Mesnard, Carriere, 1995).

*Липиды у каулимовирусов не обнаружены, а белок оболочки гликозилирован.*

Итак, шесть или иногда восемь ОРС (предположительно генов) находятся на  $\alpha$  (альфа) нити.  $\beta$  (бета) нить является некодирующей. Транскрипция происходит в ядре с ДНК-матрицы со свойствами мини-хромосомы. Выявлены два транскрипта – 19S и 38S, которые списываются с ОРС VI и транслируются в белок 62 кДа, обнаруженный в цитоплазматических вирусных включениях. Именно в них накапливается большая часть зрелых вирусных частиц. Такие электронноплотные включения характерны для этого рода. Транскрипт 35S не транслируется *in vitro*, он длиннее на 180 нт. вирусной ДНК полной длины за счет терминальных повторов и считается матрицей для репликации вирусного генома путем обратной транскрипции. ОРС V, возможно, кодирует фермент репликации (цит. по: В.Г. Краев, 2000).

*Антигенные свойства.* Каулимовирусы хорошие иммуногены, между некоторыми видами рода обнаружено антигенное родство капсидных белков. К ВМЦК получена специфическая кроличья поликлональная антисыворотка, которая реагировала в РДД с очищенным вирусным препаратом в разведении 1:1280 (Pirone et al., 1961). Другие исследователи (Hagen et al., 1982) иммунизировали молодых кроликов в подушечки лап дозой 50–125 мкг вируса в 0,1 мл 10 мМ трис-НСI, рН 7,5, с полным адьювантом Фрейнда, а через 10 дней авторы повторно ввели иммуноген в количестве 20–60 мкг с неполным адьювантом Фрейнда. Через 30 дней они провели первое взятие крови у животных. Поддерживали антителообразование у кроликов реиммунизацией – вводили 20 мкг препарата вируса каждые 2 мес. В литературе можно встретить описание и других схем иммунизации (Pirone et al., 1961; Melcher et al., 1980). К ВМЦК получены не только кроличьи, но и мышьиные антитела путем 4-кратных инъекций дозами антигена 150–500 мкг интраперитонеально (George, Converse, 1988).

Методом РДД установлено наличие идентичных эпитопов у ВМЦК и других каулимовирусов: мозаики георгины *Dahlia mosaic virus* (Brunt, 1966), окаймления жилок земляники *Strawberry vein banding virus* (Morris et al., 1980), красной кольцевой пятнистости черники *Blueberry red ringspot virus* (Hepp, Converse, 1987). С помощью ИФА показали степень антигенного родства (от близкого до отдаленного) между ВМЦК и другими видами рода (Morris et al., 1980). Однако родство КБ ВМЦК получено не со всеми известными каулимовирусами, например, оно не выявлено с каулимовирусом мозаики мирабилиса *Mirabilis mosaic virus* (Richins, Shepherd, 1983).

В целом необходимо отметить, что на сегодняшний день антигенные взаимоотношения каулимовирусов изучены недостаточно. Анализ антигенной структуры капсид-



ных белков ВМЦК практически не проводился. Антигенные взаимоотношения штаммов ВМЦК в литературе не описаны. Показано лишь, что в РДД штаммы формируют идентичные полосы преципитации (Du Plessis, Wechmar, 1981). Перспективным в выяснении изменчивости антигенных детерминант белков оболочки штаммов ВМЦК является сравнительный иммунохимический анализ, основанный на высокочувствительных методах, таких как ИФА и иммуноблоттинг, с использованием поли- и моноклональных антител. Обоснованность такого подхода подтверждена при изучении штаммов вирусов родов *Poty-*, *Potex-*, *Tobamovirus* и др. (Гнutowa, 1993).

**Биологические свойства.** В естественных условиях вирус заражает многие виды растений из семейства крестоцветных. Вирусное поражение ВМЦК посадок капусты известно с начала XX века. Schultz (1921) описал мозаичную болезнь китайской капусты, горчицы и турнепса. Впоследствии ВМЦК описали на сурепице яровой *Brassica campestris* и капусте огородной *Br. oleracea* (Garrett, 1982) и было показано, что вирус имеет широкое распространение на диких и культурных видах растений семейства *Brassicaceae*. Первые сообщения о массовом вирусном поражении разных видов капусты (цветная, кормовая, кочанная, кольраби) в СССР появились в 40-х гг. XX века, а в 1949 г. вирусное заболевание широко распространилось на капустях в Азербайджане, в 1958 г. – в Средней Азии, в 1964 г. – в Краснодарском крае (Власов и др., 1973). По литературным данным географическое распространение вируса чаще всего встречается в умеренной зоне.

ВМЦК первоначально имел несколько видовых названий: *Brassica virus 3*, *Broccoli mosaic virus*, *Cabbage mosaic virus*, *Cabbage virus B* (Shepherd, 1970). На первых этапах идентификации вируса, вызывающего мозаичные симптомы на растениях семейства крестоцветных, было показано, что они вызываются не одним, а двумя вирусами, передающимися тлями (Walker et al., 1945). Один был назван вирусом мозаики цветной капусты, другой – вирусом мозаики турнепса. Первая обстоятельная публикация по биологическим свойствам ВМЦК (симптоматология, круг растений-хозяев, передача насекомыми, распространенность и др.) принадлежит Broadbent (1957).

В странах АТР вирус, вызывающий заболевание цветной капусты, был зарегистрирован в Японии – 1937 г. (цит. по: Tomaru, 1998), в Китае – 1979 г. (цит. по: Liang, 1998), а также в Приморском крае, на юге ДФО в частности (Tolkach, Gnutova, 2000).

Вирус обнаружен в естественных условиях на растениях из семейства крестоцветных: капусте – брюссельская, цветная, кольраби, кормовая, китайская, кочанная (Shukla, Schmelzer, 1972; Schoelz et al., 1986; Al-Kaff, Covey, 1995; Raybould et al., 1999); редисе, турнепсе, дайконе, рапсе, а также на нескольких видах сорных и дикорастущих крестоцветных, например сурепке обыкновенной *Barbarea vulgaris* R. Br. (Власов и др., 1973). На листьях растений, инфицированных вирусом, наблюдали вначале посветление жилок, а затем появление темно-зеленого окаймления вокруг них. Листья могут приобретать уродливую форму (Shukla, Schmelzer, 1972). Растения нередко отставали в росте, молодые листья могли деформироваться. У цветной капусты чаще всего не образовывался цветонос. ВМЦК довольно часто встречался в сме-

шанной инфекции с вирусом огуречной мозаики и (или) вирусом мозаики турнепса (Толкач и др., 2002).

Экспериментальный круг растений-хозяев ограничен, как правило, видами растений семейства крестоцветных. Однако описаны оригинальные штаммы ВМЦК, которые заражают некоторые виды из семейства пасленовых: дурман обыкновенный *Datura stramonium* L., табак *Nicotiana* sp. L. (Mevel, Kerlan, 1990). Так, штамм ВМЦК Cabb-B вызывает локальные поражения на дурмане и табаках Бигелова *N. biglovii* (Torr.) S. Wats и Эдвардсона *N. edwardsonii* L. Другой штамм ВМЦК-D4 вызывал у этих тест-растений локальные некротические поражения и системную крапчатость. Индивидуальной особенностью этого штамма являлось то, что он не заражал горчицу черную *Br. nigra* и редис посевной *Raphanus sativus*. Штамм ВМЦК-W260 у этих видов растений семейства пасленовых вызывал только системную крапчатость (Schoelz, Shepherd, 1988). Следовательно, в зависимости от штамма ВМЦК круг восприимчивых растений, симптомы проявления инфекции и некоторые другие свойства могут значительно варьироваться. Изучались биологические свойства 18 изолятов ВМЦК, поражающих растения семейства пасленовых, (Mevel и Kerlan, 1990). Авторы установили, что 9 изолятов способны поражать растения дурмана обыкновенного, образуя на листьях хлоротические пятна, иногда переходящие в некрозы; французский и аргентинский изоляты ВМЦК заражали растения табака Бигелова, вызывая точечные некрозы. Инфекция многих изолятов сопровождалась некротизацией на листьях табака *N. clevelandii* A. Gray. Для 6 изолятов системным хозяином явились растения *N. benthamiana* Domin., который реагировал на заражение хлорозом и (или) посветлением жилок листа. Растения табака Эдвардсона, клейкого *N. glutinosa* L., настоящего *N. tabacum* L. cvs. Turkish, Samsun, Xanthi и махорки *N. rustica* L. реагировали лишь хлоротичным повреждением листа. Только растения табака Дебнея *N. debneyi* Domin. оказались невосприимчивыми ко всем изолятам ВМЦК (табл. 8).

Таблица 8

Некоторые характеристики штаммов ВМЦК (по: Богунов, 2004)

Штамм	Симптомы	Способность заражать растения		Передача тлей <i>M. persica</i>	Авторы
		Семейство <i>Brassicaceae</i>	Семейство <i>Solanaceae</i>		
Cabb-B	L: C1Sp	+	+	+	Shepherd, 1976
W260	S: C1Mot	+	+	+	Schoelz, Shepherd, 1988
D4	L: NVe; S: C1Sp	+	+	+	Schoelz et al., 1986
CM 1841	S: C1Ve	+	-	+	Sanger et al., 1991
D/H	S: C1Ve	+	-	+	- » -
NY 8153	S: C1Ve	+	+	+	Lung, Pirone, 1973
Campbell	L: N	+	+	-	Woolston et al., 1983
CM4-184	S: C1Ve	+	-	-	- » -
Aust	S: C1Ve	+	-	+	Al-Kaff, Covey, 1994
11/3	S: C1Ve; St	+	-	+	- » -



Венгерские изоляты ВМЦК кроме системной реакции на отдельных видах редко, но вызывали появление хлоротичных пятен некротического характера (Horvath et al., 1980). Растение арабидопсис *Arabidopsis thaliana* L. на заражение большинством штаммов ВМЦК реагировало системно, вызывая посветление жилок, хлоротичную пятнистость, задержку роста (Balazs, Lebeugier, 1981). Однако симптомы заражения ВМЦК у отдельных штаммов могут отличаться. Так, штаммы CaNB2, CaBV1 и NY 8153 на листьях растения арабидопсиса вызывали задержку роста растений и усиливали зубчатость розеточных листьев. Изолят ВМЦК CabBV-D вызывал хлороз у основания листьев, а изолят NY 8153 – хлороз ближе к вершине листа (Melcher, 1989).

Множественно доказана способность одного и того же изолята ВМЦК вызывать различные реакции у близких видов растений-хозяев. В этом отношении наиболее показательна различная чувствительность разных видов капусты *Brassica* sp. L. на инокуляцию ВМЦК. Турнепс *B. rapa* L. считается высокочувствительным растением, так как на нем симптомы появляются быстро в виде сильного посветления жилок листа с последующим развитием сильного хлороза, характерна также заметная остановка в росте. В то же время растения капусты кольраби *B. caulorapa* Pasq. являются бессимптомными носителями вирусной инфекции, лишь иногда на старых листьях наблюдается средний хлороз жилок (Broadbent, 1957; Saunders et al., 1990).

Исследования симптомов, вызываемых различными изолятами ВМЦК, проведены в США (Al-Kaff, Covey, 1995). Авторы сравнивали симптомы, вызываемые 39 изолятами ВМЦК, собранными по всему миру. Более четко на заражение реагировали растения турнепса – локальные повреждения появлялись на 4–10-й день после инокуляции, либо развивались симптомы системного характера на 10–20-й день. Причем окраска симптомов на инокулированных листьях турнепса варьировалась от темно-зеленой, с различной степенью посветления жилок, до сильного хлороза. Было отмечено также характерное искривление растений (от слабого до сильного) и задержка роста. Наблюдались различные типы морщинистости листа. На растениях кольраби слабые симптомы (посветление жилок, слабый хлороз) появлялись только на старых листьях, внешний вид растений не изменялся. Некоторые изоляты ВМЦК не вызывали явных симптомов вирусного поражения и присутствовали в латентной форме.

ВМЦК, выявленный в Приморском крае на растениях цветной капусты *B. cauliflora* (Mill.) Litz. сортов МОВИР и Снежный шар, вызывал хлоротичную крапчатость и хлороз участков листа вдоль основной и средних жилок, а также дубовидный узор. Растения редиса посевного *Raphanus sativus* L. сортов Родос, Красный великан, Жара, Илка и Рубин реагировали хлоротичной крапчатостью или хлорозом жилок листа, растения репы сорта Петровская, дайкона сортов Шогоин, Зеленый, Белый клык – ярким хлорозом жилок, деформацией листа (Tolkach, Gnutova, 2002; Гнутова, Толкач, 2002).

Различный характер проявления симптомов заражения у растений отдельных сортов, как предположили N. Olszewski с соавт. (1993), определялся регуляцией интенсивности транскрипции вирусной мини-хромосомы (комплекса вирусной суперскрученной ДНК (ss-ДНК) с хозяйскими белками) растением-хозяином. S.N. Covey

с соавт. (1990) подтвердили эти предположения и показали, что чувствительные растения капусты накапливают вирус в высокой концентрации, содержат в большом количестве РНК и продукты обратной транскрипции вируса, но имеют низкий уровень ss-ДНК. Напротив, устойчивые виды капусты, дающие небольшой выход вируса, содержат низкий уровень вирусных РНК-транскриптов, так как большая часть ss-ДНК ВМЦК собрана в неактивной форме. На этом основании был сделан вывод, что чувствительность к вирусу растений-хозяев определяется способностью растений транскрибировать вирусную мини-хромосому. Кроме того, круг поражаемых растений-хозяев и симптомы вирусного поражения у определенного штамма вируса зависят и от особенностей генетической структуры определенных участков его генома (Qiu, Schoelz, 1992). Помимо генетических особенностей растений-хозяев и штаммов вируса, на симптомы инфекции, а также на интенсивность накопления ВМЦК в клетках могут оказывать влияние внешние факторы. Так, японскими исследователями показана зависимость между скоростью репродукции вируса и температурным режимом выращивания растений-хозяев. В частности, выход вируса при его выделении из растений турнепса, выращиваемых при температуре  $30 \pm 5$  °С, составлял не более 1,5 мг/кг листовой массы, а при  $20 \pm 5$  °С – до 10 мг/кг. Этими же авторами установлено, что при температуре 33 °С симптомы маскируются, а выше 35 °С вирус не размножается, по их данным, оптимальный режим репродукции ВМЦК лежит в пределах  $20 \pm 5$  °С (Yamaoka et al., 1982).

Наиболее чувствительными к механической инокуляции являются молодые растения, особенно их не полностью сформировавшиеся листья. Это связано с тем, что вирусная инфекция не оказывает существенного воздействия на физиологические и биохимические процессы уже дифференцированных тканей. Однако отдельные штаммы ВМЦК, относящиеся к «суровым», способны вызывать заметные изменения в течение вегетативного развития хозяина (Sohal et al., 1999). Полностью сформировавшиеся листья являются практически невосприимчивыми к инокуляции вирусом (Melcher, 1989).

Таким образом, штаммы ВМЦК способны поражать растения главным образом семейства крестоцветных, в редких случаях – семейства пасленовых. Симптомы инфекции зависят от вида хозяина, штамма вируса, а также от условий выращивания растений.

ВМЦК способен наносить значительный экономический ущерб сельскому хозяйству в основном за счет поражения посадок капусты. Урожай растений капусты, зараженных ВМЦК на ранней стадии их роста, снижался на 50–75% (Natti, 1956). В начале 1960-х г. в отдельных районах ГДР наблюдалось массовое заболевание цветной капусты, приведшее к потери около 80% урожая (Staar, 1962). В течение 1992 г. в Англии и Уэльсе 14% возделываемых сортов масленичного рапса *B. napus* L. были заражены ВМЦК. Уже в следующем году вирусом были инфицированы уже 25% сортов. Такие потери урожая представляют серьезную угрозу для производства важного продукта питания – рапсового масла (Hardwick, 1994). В 1999 г. 60% посадок огородной капусты *B. oleracea* L. в Великобритании было поражено ВМЦК (Raybould et al., 1999).



ВМЦК не передается через семена, несмотря на то, что вирус обнаруживали в тканях семян растений пастушьей сумки обыкновенной *Capsella bursa pastoris* и дайкона *Raphanus raphanistrum* (Tomlinson, Walker, 1973). Вирусная нуклеиновая кислота выявлялась в кожуре семян, например у *A. thaliana*, но не обнаруживалась в эмбрионе (Melcher, 1989). Однако ВМЦК влиял на всхожесть семян, снижая ее до 100%, возможно, за счет повреждения зародыша. Иногда больные растения производили мелкие семена с тонкой морщинистой оболочкой. Нередко оболочка семени имела полосчатость. Такие семена плохо хранились и, даже если рассада все-таки была получена из них, никогда не вырастали в фертильные растения (Melcher, 1989).

По литературным данным, ТТИ вируса – 75–80 °С. ВМЦК может сохраняться в соке при 20 °С в течение 5–15 дней, ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-5}$  (Garrett, 1982). В зависимости от штамма вируса физические свойства вириона могут варьироваться. Например, один из дальневосточных изолятов (ВМЦК 6) терял инфекционность при выстаивании сока при комнатной температуре в течение 1 сут, в то время как другие (ВМЦК<sub>0</sub>, ВМЦК 1, ВМЦК 7) – 4 сут (Gnutova, Tolkach, 2002). Вирионы вируса стабильны, сохраняли инфекционность после трех циклов замораживания–оттаивания (–20...+4 °С) без использования криопротекторов (Melcher et al., 1980).

**Передача.** Распространение вируса в полевых условиях происходит с помощью тлей. Показана способность передачи ВМЦК в природе, по крайней мере, 27 видами тлей (Kennedy, 1962). Изучалась специфичность передачи вируса разными видами тлей, основные из них оказались тля капустная *Brevicoryne brassicae* L. и персиковая *Myzus persicae* Sulz. Наиболее изученный переносчик для этого вируса – тля персиковая (Day, Venables, 1961; Namba, Sylvester, 1981). Показано, что *M. persicae*, питаясь на растениях семейства крестоцветных, зараженных одновременно ВМЦК и вирусом черной кольцевой пятнистости капусты, передавала оба вируса, а тля полосатая *M. ornatus* Rond. – только ВМЦК (Shukla, Schmelzer, 1972). Перенос вируса осуществлялся полуперсистентно (с помощью стилета). Инфицирующая способность, например, капустной тли *B. brassicae* сохранялась до двух дней и более (Markham et al., 1987).

Однако не все штаммы ВМЦК передавались тлями. При изучении 5 штаммов вируса показано, что два из них (Cabbage В и NY 8153) легко передавались тлями, штамм (КК) – хуже и два других (Campbell, CM4-184) не переносились насекомыми вовсе (Lung, Pirone, 1973). Многие исследователи показали, что перенос вирионов ВМЦК тлями не является чисто механическим процессом, в нем участвует ряд вирускодируемых белков. Например, передача вируса тлями зависит от белка с м.м. 18 кДа (P18), названного фактором переноса (aphid transmission factor – ATF), который нарабатывается в инфицированных растениях (Lung, Pirone, 1974; Espinoza et al., 1988). Позже в составе генома ВМЦК был выявлен участок (ОРС II), кодирующий данный белок (Armour et al., 1983; Woolston et al., 1987; Harker et al., 1987). В листьях, инфицированных CM4–184 изолятом, невозможно выявить P18, поскольку в ОРС II имеется делеция и данный белок не образуется (Howarth et al., 1981). Ткани, инфицированные Campbell изолятом вируса, содержали P18, но в небольшом количестве. Остается невыясненным, то ли у этого изолята была снижена экспрессия ОРС II, то ли P18 не от-

личался стабильностью (Harker et al., 1987). Показана способность данного белка образовывать внутри клетки паракристаллические образования, которые связывались с системой клеточных микротубул. Как такие образования оказывали влияние на передачу вирионов тлями, остается до сих пор невыясненным (Kasteel et al., 1996; Blanco et al., 1996).

Изучение механизмов передачи вируса тлями способствовало разработке мероприятий по защите растений от ВМЦК. Так, показано, что после обработки культурных растений семейства крестоцветных препаратом Pymetrozine в концентрации 100 мг/л *M. persicae* теряли способность переносить вирус (Bedford et al., 1998).

Отдельные виды рода *Caulimovirus* передаются на здоровое растение прививкой (Lauson, Civerolo, 1978; Petrzik et al., 1998).

Резерваторами ВМЦК могут являться сорняки из семейства крестоцветных. Вирус зимует в кочерыжках растений капусты, оставленных в поле, и сорных растениях семейства *Brassicaceae*, а также сохраняется в зараженных маточных растениях, оставленных на семена.

**Цитопатологические свойства.** Репликация ВМЦК сопровождается появлением специфических изменений в клетках пораженных растений, хорошо видимых в световом микроскопе. Под влиянием вирусной инфекции образуются округлые внутриклеточные включения (вироплазмы, X-тела), впервые обнаруженные испанскими биологами (Rubio-Huertos et al., 1968). Обычно включения встречаются в клетках цитоплазмы в виде округлых или эллиптических органелл, реже в ядрах (Gracia, Shepherd, 1985). Биохимический и структурный анализы вироплазм показали, что они состоят из компактного материала, предположительно, белковой природы и РНК (Martelli, Castellano, 1971; Xiong et al., 1982). Включения содержат также массу сферических частиц вируса, не образующих агрегаты. Особо большое скопление вирусных частиц наблюдается на поверхности X-тела. Эти сферические частицы включений рядом авторов были разделены на два типа. Первый тип – электронно-плотные, сферические, диаметром 35–45 нм, которые напоминают собственно частицы вируса. Второй тип – электронно-прозрачные, названные «неполными», так как предполагается, что они не содержат нуклеиновой кислоты.

Вирионы не обнаружены в хлоропластах и митохондриях. Иногда в органеллах наблюдаются морфологические изменения: ядра могут иметь расширенные нуклеолы и содержать плотный гранулярный материал, а также выросты ядерной мембраны внутрь ядра (Rodriguez et al., 1988). Ряд штаммов образуют в хлоропластах агрегаты, природа которых еще не изучена (Shepherd et al., 1980).

По данным световой микроскопии, одни штаммы ВМЦК образуют не более одного–двух крупных X-тел в цитоплазме клеток, причем их расположение не строго околоядерное, в то время как другие – от 6 и более мелких X-тел на клетку. Последние локализуются строго околоядерно в плотном матриксе. Размеры варьируются у разных штаммов от  $0,3 \times 106$  нм до  $10 \times 106$  нм (Shepherd et al., 1980).

Различная насыщенность включений вирионами ВМЦК определяется условиями выращивания зараженных растений. Так, вироплазмы растений, произрастающих



при температуре  $30 \pm 5$  °С содержали около 63 частиц/мкм<sup>2</sup>, а при 20 °С – около 183 (Yamaoka et al., 1982).

Попытки обнаружить признаки репликации вируса внутри включений не увенчались успехом. Все данные свидетельствуют, что включения не вовлечены в процесс репликации вирусной ДНК, а, вероятнее всего, являются местом сборки вируса (Ansa et al., 1982).

Одним из специфичных индуцируемых ВМЦК ультраструктурных изменений в клетках считается появление пальцеобразных выпячиваний клеточной стенки внутри цитоплазмы (Conti et al., 1872). Часто рядом с такими выростами наблюдают группы пузырьков и свернутых мембран. Предполагается, что появление таких новообразований связано с повышением синтетической активности плазмалеммы (Bassi et al., 1974).

Таким образом, после инфицирования растения вирус в клетке хозяина вызывает специфические изменения ультраструктуры и появление новых, не характерных для здоровой растительной клетки цитоплазматических и органоидных образований (вироплазм), локализация и морфология которых типичны только для вирусов рода *Caulimovirus*: вирусные включения накапливаются в цитоплазме, у некоторых видов – в ядре.

Выявление ВМЦК в больном растении с помощью световой микроскопии широко использовалось на начальных этапах работы с вирусом (Rodríguez et al., 1988). Как упоминалось выше, практически во всех инфицированных ВМЦК клетках растений происходят характерные морфологические изменения, заключающиеся в появлении крупных вакуолеподобных образований, интенсивно связывающих цитологические красители (толуидиновый синий, метиленовый зеленый и др.). За последние 2–3 десятилетия помимо ВМЦК описан ряд каулимовирусов, образующих в клетках больных растений подобные структуры. Поэтому в настоящее время метод как диагностический тест используют при отнесении исследуемого вида к роду *Caulimovirus*.

**Диагностика.** Традиционная иммунодиагностика фитовирусов, в том числе и ВМЦК, основывается главным образом на антигенных свойствах капсидных белков вирусов, к которым приготовлены специфические антисыворотки. Несмотря на то что многим исследователям удалось получить антисыворотки с высоким содержанием противовирусных антител, диагностировать ВМЦК с помощью иммунохимических методов затруднительно. Как оказалось, РДД не всегда способна выявлять вирус в соке инфицированного растения, так как в соке свободные вирусные частицы практически отсутствуют, а антисыворотка не взаимодействует с цитоплазматическими включениями, содержащими вирионы (Mraz et al., 1997). Из-за медленной диффузии вируса в агаровом геле линии преципитации образуются только на 3–4-й день и, как правило, очень тонкие и слабо заметные (Hagen et al., 1982). С помощью радиоактивного мечения вирионов ВМЦК установлено, что противовирусные антитела обладают низкой avidностью (Melcher et al., 1980). Разрешающая способность РДД для данного вируса невысокая – 0,05 мг/мл (Hagen et al., 1982). Таким образом, использование такого простого и наглядного метода в случае ВМЦК не всегда дает положительные результаты.

Более чувствительный прямой вариант радиоиммунологического анализа (РИА) для выявления ВМЦК также оказался не очень эффективным. При использовании поликлональной антисыворотки, приготовленной против ВМЦК, с титром в РДД 1:512 и меченым радиоактивным йодом ( $^{125}\text{I}$ ), вирусный белок выявить в соке инфицированных растений не удалось (Melcher et al., 1980). Только после обработки антигенов мочевиной и детергентом ВМЦК выявили в инфицируемом растении (чувствительность 10–20 нг/мл). Но РИА – трудоемкий метод, кроме того, часто в ходе его постановки возникали артефакты, происхождение которых трудно было объяснить.

С чувствительностью, подобной для РИА, но лишенный описанных недостатков, вирус был выявлен методом ракетного иммуоэлектрофореза (РИЭФ) (чувствительность 25 нг/мл). Перед постановкой аликвоты сока подвергали ультрацентрифугированию для концентрирования вируса, что ограничивало использование метода при исследовании большого числа образцов (Hagen et al., 1982).

Надежным методом детекции ВМЦК в соке листьев, протопластах и тлях оказался сэндвич-вариант ИФА, позволяющий выявлять вирус в концентрации 0,1 мкг/мл (Du Plessis, Wechmar, 1981). Из-за недостаточной изученности изменчивости антигенных детерминант капсидных белков вируса возможности метода для иммунодиагностики штаммов вируса еще предстоит оценить.

В настоящее время в лабораторных исследованиях для выявления вируса в тканях инфицированных растений широко используются гибридизационные методы: блот-гибридизация нуклеиновых кислот (Rollo, Covey, 1985), вестерн-блоттинг (Burger, Duplessis, 1983), гибридизация *in situ* (Giband et al., 1984). Однако до сих пор они не нашли широкого распространения из-за сложности, затратности и необходимости подготовки высококвалифицированного персонала.

В последнее десятилетие для диагностики вирусных заболеваний, в том числе и растений, используется полимеразная цепная реакция (ПЦР). В геноме ВМЦК, несмотря на его широкую видовую изменчивость, выявлены непротивительные относительно консервативные участки, к которым можно подобрать последовательности праймеров, чтобы эффективно отжигать в реакции ПЦР последовательности всех штаммов вируса. Уже сейчас синтезированы олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие непротивительные участки ДНК ВМЦК, позволяющие выявлять 35S РНК ВМЦК в генетически модифицированных растениях (Melnychuk et al., 2002), а также 35S промотор в трансгенных продуктах питания (Wolf et al., 2000). Таким образом, на сегодняшний день существуют разнообразные чувствительные и надежные методы диагностики вируса.

**Видовое разнообразие.** В последние три десятилетия для идентификации ВМЦК наряду с традиционными методами исследования стали применять молекулярно-генетические подходы. В 80–90-х гг. XX в. распространение получил метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (МПРФ, англ. RFLP), основанный на гидролизе вирусной ДНК бактериальными рестриктазами с последующим разделением полученных фрагментов электрофорезом в агарозном или ПАА гелях (Маниатис и др., 1984). С его помощью за рубежом описано более сорока геновариантов ВМЦК,



что свидетельствовало о высокой генетической изменчивости ВМЦК (Hull, 1980). Построенные рестрикционные карты штаммов позволяли сравнивать штаммы между собой. Стало ясно, что на генетическом уровне существуют значительные отличия между изолятами вируса. Сравнивая 44 изолята вируса после гидролиза их ДНК бактериальными рестриктазами, Hull (1980) получил дискретные электрофореграммы. Например, с помощью рестриктазы *EcoRI* он выявил 10 геновариантов.

В ходе сравнительного анализа рестрикционных карт изолятов попытались выявить консервативные и вариабельные участки в геноме вируса. К наиболее изменчивым участкам ДНК ВМЦК отнесли ОРС IV и VI (Volovitch et al., 1981; Broglio, 1995). Сходные результаты получены при сопоставлении нуклеотидных последовательностей девяти секвенированных на момент исследования штаммов ВМЦК (Chenault, Melcher, 1994). Учитывая, что белковые продукты данных генов ответственны за устойчивость вириона к факторам среды и влияют на успешность инфицирования растений-хозяев, можно предположить, что возникающие в них мутации являются необходимым компонентом адаптивного потенциала вируса.

Секвенирование ДНК ряда штаммов ВМЦК (Franck et al., 1980; Balazs et al., 1982 и др.) показало, что их нуклеотидные последовательности отличались в среднем на 5%, и позволило выяснить ведущие типы изменчивости вируса и оценить ее частоту. Показано, что изменения в геноме ВМЦК происходят главным образом за счет точечных мутаций, возникающих в ходе работы ревертазы, а также за счет делеций, возникающих в ходе сплайсинга (Al-Kaff, Covey, 1995) и коротких повторов (Zhang, Melcher, 1989). На долю транзиций обычно приходится 80%, трансверсий – около 10% (Volovitch et al., 1981).

Определенную роль в изменчивости ВМЦК играют и другие реорганизации генома, например интерференция (Melcher et al., 1986) и рекомбинация (Vaden, Melcher, 1990). При заражении растения-хозяина одновременно двумя штаммами они могут размножаться параллельно. При этом клетка может содержать только один штамм. В местах инокуляции обнаруживаются оба генотипа, а в удаленных от места инокуляции – только один. Кроме того, при заражении растения штаммом, имеющим в каждой цепи ДНК мутации в несущественных для репликации вируса участках (в виде гетеродуплекса), в хозяине в дальнейшем обнаруживаются два самостоятельных штамма, имеющих по одной нити ДНК от гетеродуплекса (Riederer et al., 1992).

Поскольку мутационный процесс наблюдается относительно часто, природные популяции ВМЦК постепенно накапливают изменения. Показано, что инфекция, вызванная индивидуальным изолятом, часто содержит несколько геновариантов. Это подтверждает то, что они возникают *de novo* в ходе каждого инфекционного цикла и сохраняются в малых пропорциях по отношению к основному генотипу. Некоторые из этих новых вариантов могут обладать новыми биологическими свойствами (Al-Kaff, Covey, 1994).

Многие вопросы изменчивости вируса остаются невыясненными. Метод ПДРФ в рассматриваемой области мало информативен, а число полностью секвенированных штаммов еще мало. Небольшая величина генома ВМЦК, как и других фитовирусов,

накладывает серьезные ограничения на использование других молекулярных методов. Все это значительно затрудняет установление филогенетических взаимоотношений изолятов ВМЦК (Chenault, Melcher, 1994). Поэтому на сегодняшний день изучение генетического разнообразия ВМЦК является своевременным и актуальным.

**ВМЦК как модельная система.** Особенностью вируса является то, что его количество, с которым можно реально работать, накапливается в растении в течение достаточно большого срока с момента инокуляции (более 30 дней). С помощью модельных систем можно обойти трудности работы с целым растением. Использование модельных систем имело огромное значение для понимания механизмов функционирования генома ВМЦК, накопления продуктов его транскрипции и т. д. Наибольшее распространение получили две системы изучения патогена *in vitro*: изолированные протопласты и культура каллусной ткани. Остановимся на каждой из них подробнее.

Для получения изолированных протопластов часто используют метод японских исследователей, который оказался универсальным, поскольку дает хорошие результаты для многих растений семейства крестоцветных (Furusawa, Okuno, 1978). Для инфицирования протопластов ВМЦК разработан ряд способов равноценной эффективности: инокуляция вирионами с помощью поликагиона поли-L-орнитина (Howell, Hull, 1977); с использованием ПЭГ (Maule, 1983); вирионами, упакованными в липосомы (Hussain et al., 1985), и заражение протопластов препаратом вирусной ДНК (Yamaoka et al., 1982). Для всех указанных методов характерен высокий процент инфицирования протопластов (80–90%). В связи с этим зараженные протопласты стали удобной моделью изучения репликации ВМЦК на начальных ее этапах. Так, впервые была показана способность к репродукции вируса *in vitro* – за 72 ч, причем его концентрация возрастала в протопластах от 0,1 мкг/мл до 0,33 мкг/мл (Du Plessis, 1981). Максимальное количество вируса накапливалось к 96 ч. К этому моменту в цитоплазме протопластов формируются агрегаты вирусных частиц, напоминающие вироплазмы. Однако по данным электронной микроскопии эти образования по ультраструктуре не соответствовали им, что свидетельствовало о том, что формирование вирусных включений не является обязательным условием репродукции вируса (Maule, 1983). С помощью протопластов, изолированных из различных растений, этим автором было показано, что эффективность заражения видов растений, а также их сортов может значительно варьироваться. Например, по его данным, все сорта турнепса заражались с одинаковой эффективностью (около 90%), горчица сортов *Tendergreen* на 50–60%, а *Tilney* – только на 10%. Кроме того, он отмечал и другой интересный факт – в протопласты, выделенные из морикандии полевой *Moricandia arvensis* L. (вид растения, не поражающийся ВМЦК) проникала небольшая часть вирусных частиц (1–5%), но их репродукцию затем не наблюдали. Подобные данные имеют ценность при выявлении видовой устойчивости растений к ВМЦК.

В последнее десятилетие в связи с развитием генно-инженерных технологий система изолированных протопластов все больше используется для изучения особенностей экспрессии отдельных фрагментов вирусного генома, синтеза, строения и функционирования вирускодируемых белков (Dominguez et al., 1996; Kobayashi et al., 1998).



Культура изолированных клеток растений при изучении свойств ВМЦК используется главным образом для изучения кинетики накопления продуктов репликации вируса (Bonpeville et al., 1984; Covey, Turner, 1993). Необходимо отметить, что по сравнению с протопластами особенности репликации ВМЦК в каллусной культуре изучены сравнительно слабо. До сих пор не исследована динамика репликации ВМЦК в изолированных клетках. Представляет интерес вопрос о влиянии факторов среды на скорость размножения вируса: химические – минеральный состав, гормоны роста и т. п., физические – освещение и температура.

Стремительному развитию генетической инженерии способствовал ряд открытий XX века, из которых наиболее значимые: понимание механизмов репликации и транскрипции про- и эукариотов, открытие эндонуклеаз рестрикции и других ферментов нуклеинового обмена (полимеразы, лигазы), разработка методов культивирования клеток животных, растений, микроорганизмов, способов переноса молекул ДНК в них и др.

Наиболее часто для переноса генетической информации в растения используют плазмиды агробактерий и векторы на основе вирусов растений. При этом ВМЦК стали использовать для этих целей одним из первых. Начало в данном направлении положили исследования, показавшие, во-первых, что полная копия ДНК ВМЦК, встроенная в растение с помощью Ti-плазмиды *Agrobacteria*, сохраняет транскрипционную активность (Shewmaker et al., 1985), во-вторых, что можно вырезать из генома ОРС II без нарушения репликации ВМЦК. Кроме того, ОРС II была успешно заменена бактериальным геном дигидрофолатредуктазы, который экспрессировался в трансгенных растениях (Brisson et al., 1984).

Один из наиболее часто используемых векторов, созданных на основе ДНК ВМЦК, является pCaVCAT, принадлежащий к группе так называемых DMGT-векторов (DNA-mediated gene transfer), осуществляющих опосредованный перенос генов. В качестве селективного маркера вектор содержит бактериальный ген хром-фениколацетилтрансферазы (*cat*). Другие примеры использования ВМЦК в качестве вектора можно найти в нескольких обзорах (Brisson, Hohn, 1986; Futterer et al., 1990; Mushegian, Shepherd, 1995).

К преимуществам ДНК ВМЦК как вектора относят: сравнительно небольшой двухцепочечный геном, с которым можно легко манипулировать *in vitro*; способность сохранять инфекционность ДНК ВМЦК после выделения из вирусного препарата и клонирования; вирусная ДНК может быть введена непосредственно в растение с помощью механической инокуляции; высокая эффективность введения и легкость проведения манипуляций; в ходе системной инфекции вирус реплицируется во многих клетках хозяина и накапливается большое число копий вирусного генома и др. (Ковган, Жданов, 1989).

С помощью точечного мутагенеза, а также путем элиминации коротких фрагментов ДНК ВМЦК было установлено, что его использование в качестве вектора может быть связано с рядом трудностей: даже очень короткие вставки чужеродной ДНК

инактивируют репликацию вируса (Daubert et al., 1983; Dixon et al., 1983). Только два гена (II и VII) являются не существенными для репликации и развития системной инфекции и могут быть полностью делетированы либо расширены небольшими фрагментами чужеродной ДНК. Однако величина вставки должна быть не более 250 п.н. В противном случае наблюдается нарушение процесса упаковки вирусной ДНК в капсид и элиминация вставленного фрагмента. Определенную сложность представляет необходимость точной встройки чужеродного фрагмента ДНК (Пирузян, 1988). Этот фрагмент ДНК, встраиваемый в кольцевую молекулу ДНК ВМЦК, не имеет собственного промотора и поэтому транскрибируется в составе 35S РНК (Borneman et al., 1995).

При конструировании продуктивного вектора на основе ВМЦК необходимо также учитывать биологические свойства его штаммов, которые, как было показано выше, могут значительно варьироваться. Использовать штаммы, вызывающие локальную инфекцию, угнетение роста хозяина или накапливающиеся в низкой концентрации, не целесообразно. По-видимому, более перспективными в качестве вектора являются штаммы ВМЦК, способные системно инфицировать не только растения семейства крестоцветных, но и семейства пасленовых. Это расширяет спектр растений, которые могут быть трансформированы с применением ВМЦК.

При изучении штаммового состава ВМЦК описан штамм SM4-184, геном которого на 600 п.н. короче обычного (Hull, 1980). Если удастся расширить данный геном, то размер вставок возрастет до 850 п.н. Учитывая, что ген VII не принимает участия в развитии инфекции, размер вставок может составить около 1000 п.н., что достаточно для кодирования небольшого белка (Ковган, Жданов, 1989).

Приведенные выше факты свидетельствуют об актуальности изучения штаммового состава ВМЦК и о необходимости дальнейших исследований возможности переноса экспрессируемых генов в клетки высших растений с помощью ВМЦК.

Однако более плодотворным оказался другой способ использования ВМЦК в геной инженерии, а именно использование промоторных областей 35S и 19S РНК транскриптов. Наибольшее распространение получил 35S промотор, представляющий собой последовательность около 600 п.н., содержащий регуляторные элементы (Hemmings-Mieszcak, 1998). Обнаружено сходство регуляторных элементов 35S промотора (последовательности типа ТАТА-бокс, СААТ-бокс, инвертированные повторы) с таковыми у генов животных и растений (Turner et al., 1996). Значительную часть промотора занимает участок, подобный энхансерному в системах регуляции экспрессии генов эукариот. Энхансер содержит два домена: домен А регулирует экспрессию главным образом в тканях корней, домен В включает пять субдоменов, регулирующих активность промотора в различных тканях растения (Benfey et al., 1990 а; Benfey et al., 1990 б). Недавно показана зависимость между активностью доменов энхансерного элемента 35S промотора и активностью трансляции белков с полицистронной 35S РНК (Ryabova et al., 2000). Детальное знание структуры и функционирования промотора в будущем позволит создать векторные конструкции с заданными параметрами экспрессии.



35S промотор способен обеспечить стабильную экспрессию интересующего гена во многих типах клеток трансгенных растений и других организмов. Исключением являются лишь клетки на ранней стадии эмбриогенеза (Sunikumar et al., 2002). При сравнении 35S промотора ВМЦК с другими, часто используемыми для трансформации высших растений, например, с *rolC* промотором *Agrobacterium rhizogenes*, оказалось, что 35S промотор сохраняет высокую активность на протяжении всего жизненного цикла растения, практически не угнетается изменениями температуры и другими климатическими факторами (Pauk et al., 1995; Nilsson et al., 1996). Кроме того, он не проявляет тканеспецифичности экспрессии, что дает возможность экспрессии генов различных организмов, включая высших (животных и человека). Например, под контролем 35S промотора ВМЦК в трансгенном картофеле успешно экспрессировался ген фактора эпидермального роста человека (Salmanian, 1996); в двух видах трансгенных грибов экспрессировался ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (Sun et al., 2002). Однако промотор 35S РНК ВМЦК нельзя считать универсальным, поскольку в тканях отдельных видов растений его активность ниже, чем у промоторов других организмов (Keinonen-Mettala et al., 1998).

За последнее десятилетие получено множество важных для сельскохозяйственного производства трансгенных растений, несущих гены устойчивости к определенным факторам и функционирующих под контролем 35S промотора. Например, с помощью агробактериальной трансформации были трансформированы геном *CaMV-35S*-неомицин-форфотрансферазы ткани незрелых семян гороха *Pisum sativum* L., из которых в ходе органогенеза получены растения, способные продуцировать жизнеспособные семена. Полученные трансгенные растения гороха были устойчивыми к гербициду Basta (Schroeder et al., 1993).

Таким образом, данное направление позволяет преодолеть многие из указанных выше трудностей. В целом использование ВМЦК в качестве клонирующего и экспрессионного вектора имеет большие перспективы. В заключение необходимо отметить, что в связи с многочисленными и успешными работами по расшифровке организации генов других каулимовирусов, последние также находят широкое применение в геной инженерии (Maiti, Shepherd, 1998).

Характеризуя род *Caulimovirus*, мы описывали его особенности, используя главным образом данные, имеющиеся в литературе по типовому виду рода – вирусу мозаики цветной капусты. Однако эта информация будет неполной, если мы более подробно не отразим свойства дальневосточных изолятов ВМЦК.

### Вирус мозаики цветной капусты

#### *Cauliflower mosaic virus*

На юге ДФО ВМЦК был выделен из культурных растений семейства крестоцветных (табл. 9): капусты цветной и белокочанной, редиса и дайкона (Gnutova, Tolkach,

2000; Гнutowa, Толкач, 2002; Толкач и др., 2002; Gnutova et al., 2002; Толкач, Гнutowa, 2008). Ранее вирус был зарегистрирован в регионах бывшего СССР – в Краснодарском крае, Азербайджане и республиках Средней Азии.

Таблица 9

## Изоляты ВМЦК, выявленные в Приморском крае на овощных культурах

Изолят	Место сбора материала	Растение-хозяин
ВМЦК <sub>0</sub>	г. Артем Приморского края, частное хозяйство	<i>Brassica cauliflora</i>
ВМЦК 1	ОПХ с. Пуциловка Уссурийского района	<i>Br. oleracea</i>
ВМЦК Р1	ДВ опытная станция ВИР, г. Владивосток	<i>Raphanus sativus</i>
ВМЦК Д	г. Артем, Дальневосточная опытная станция ВНИИО	<i>R. raphanistoides</i>
ВМЦК Р2	г. Артем Приморского края, частное хозяйство	<i>R. sativus</i>
ВМЦК 6	ОПХ с. Пуциловка Уссурийского района	<i>Br. oleracea</i>
ВМЦК 8		
ВМЦК 7		<i>Br. cauliflora</i>

Примечание. ВМЦК Р1 и Р2 – изоляты из редиса, ВМЦК<sub>0</sub> и ВМЦК 7 – из цветной капусты, ВМЦК 1, 6 и 8 – из капусты белокочанной. ВМЦК Д – из дайкона.

Возделываемые растения семейства *Brassicaceae* являются важнейшими сельскохозяйственными культурами, которые поражаются многими патогенами, в том числе и вирусной этиологии. Известно, что на культурных, сорных и дикорастущих видах растений этого семейства выявлены следующие вирусы: комовирус мозаики редиса *Radish mosaic comovirus*, потивирус мозаики турнепса *Turnip mosaic potyvirus*, кукумовирус огуречной мозаики *Cucumber mosaic cucumovirus*, собемовирус розеточности турнепса *Turnip rosette sobemovirus*, кармовирус крапчатости турнепса *Turnip crinkle carmovirus*, тумовирус желтой мозаики турнепса *Turnip yellow mosaic tymovirus*, caulимовирус мозаики цветной капусты *Cauliflower mosaic caulimovirus*, циторабдовирус некротической желтухи брокколи *Broccoli necrotic yellow cytorhabdovirus* (Brunt et al., 1995) и др. Однако среди перечисленных вирусов наиболее распространенными и вредоносными являются два – вирусы мозаики турнепса и мозаики цветной капусты (Tomlinson et al., 1973; Shukla, Schmelzer, 1972; Juretic et al., 1973). Кроме того, в посадках растений семейства крестоцветных нередко эти вирусы встречаются в смешанной инфекции не только друг с другом, но и с вирусом огуречной мозаики (Spak, Novikov, 1994).

О вирусах, поражающих на юге ДФО культурные растения семейства крестоцветных, до последнего времени было известно крайне мало. Ранее были идентифицированы только два – вирусы мозаики турнепса и мозаики редиса (Крылов и др., 1981; Гнutowa, 1993; Толкач, 1995). Поэтому исследования по идентификации изолятов ВМЦК в последние годы проводились в России впервые.

*Изоляты ВМЦК, выявленные из капусты цветной и белокочанной и редиса.* По литературным данным, как мы отмечали выше, экспериментальный круг



тест-растений для ВМЦК ограничивается главным образом растениями семейства *Brassicaceae*. Поэтому для сравнительной характеристики изучаемых изолятов вируса (три изолята из белокочанной капусты – ВМЦК 1, ВМЦК 6, ВМЦК 8, два из цветной капусты – ВМЦК 0 и ВМЦК 7, два из редиса – ВМЦК Р1, ВМЦК Р2 и один – из дайкона) (табл. 9) во время опытов мы заражали только растения этого семейства, используя 20 видов и сортов (табл. 10).

Таблица 10

## Реакция тест-растений на заражение дальневосточными изолятами ВМЦК

Тест-растения	ВМЦК 1	ВМЦК 6	ВМЦК 7	ВМЦК 8	ВМЦК Р1	ВМЦК Р2
<i>Brassica oleracea</i>	S: CIVe	S: CIMot	S: CIVe	–	S: M	S: CIM
<i>Br. cauliflora</i> , сорта: МОВИР	S: M	–	S: CIVe	S: CIM,Dis	–	–
Снежный шар	S: CIVe	S: CIVe, Dis, Mot	S: CIStr	–	S: CIVe	S: CIVe
<i>Brassica nigra</i>	S: CIM	S: CIMot	–	–	–	S: CIVe
<i>Br. juncea</i>	S: CIM	–	S: CIVe	–	–	S: CIVe
<i>Hesperis matronalis</i>	–	S: CIVe, Dis	L: RSp, S: CIVe	–	–	S: CIMot
<i>Iberis amara</i>	–	–	S: CIVe	–	–	–
<i>Matthiola incana</i>	S: M, Dis	–	S: CIMot, Dis	–	–	–
<i>Raphanus sativus</i> , сорта: Родос	S: CIVe	S: M	S: CIVe	–	–	S: CIStr
Рубин	–	S: CIVe, Dis	S: CIVe	–	–	S: CIM
Илка	–	S: CIStr	S: CIVe	–	S: IStr	–
Розово-красный с белым кончиком	S: CIM	S: M	S: CIVe	–	S: CIVe	S: CIVe
<i>R. raphanistroides</i> , сорта: Мисато	–	–	–	–	–	–
Розовый блеск	S: CI, Dis	–	S: CIVe, RSp	S: CIMot	S: M	–
Шогоин	S: Mot, VC	S: VC	S: VC	S: CIMot	–	–
Зеленый	S: CIMot	S: Mot	S: CIVe	–	–	–
Белый клык	S: CIVe, RM	S: Mot	S: VC, RM	S: CIM	S: CIVe	S: CIVe
Клык слона	S: CIVe	–	S: CIVe	–	S: CIVe	S: CIVe
Миясиге	–	–	S: CIVe	–	S: CIM	S: CIVe
<i>Sinapis alba</i>	–	–	–	–	–	S: CIVe
<i>Sinapis arvensis</i>	S: CIVe	–	–	–	–	S: CIVe, CIM

Полученные результаты показали, что симптоматология и круг поражаемых растений для всех изолятов не одинаковы. Так, изолят ВМЦК 7 по сравнению с другими заражал довольно широкий круг тест-растений, а изоляты ВМЦК 8 и ВМЦК Р1, наоборот, ограниченный.

В качестве переносчика вируса использовали тлю персиковую. Размножали ее на молодых растениях дурмана обыкновенного *D. stramonium* и бобах конских *Faba bona*. Для того чтобы убедиться в стерильности тлей, их переносили на здоровые растения дурмана и бобов, которые затем проверяли на наличие вирусной инфекции, используя индикаторные растения. Тлей собирали в стеклянные бюксы и держали в темноте без пищи около 3 ч. Затем их осторожно мягкой кисточкой помещали на зараженное растение. В течение 1 ч тли питались соком. После этого насекомых переносили на здоровое растение на сутки, затем их уничтожали. О передаче вируса тлями судили визуально по появлению симптомов, а затем проверяли на индикаторных растениях и электронно-микроскопическим методом (Толкач и др., 2002).

Физические свойства у изучаемых изолятов ВМЦК также различались (табл. 11).

Таблица 11

Физические свойства дальневосточных изолятов вируса мозаики цветной капусты

Параметры	Изоляты								
	ВМЦК Д	ВМЦК <sub>0</sub>	ВМЦК1	ВМЦК7	ВМЦК8	ВМЦК6	ВМЦК Р1	ВМЦК Р2	ВМЦК*
ТТИ, °С	65–70	80	85	80	75	80	80	80–85	75–80
ПСИ, сут	1	1	3–4	4	1	4	2	2	4
ПРС	$10^{-1}$ – $10^{-2}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-1}$ – $10^{-2}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	$10^{-3}$ – $10^{-4}$

\* По: Garnett, 1982.

Наименее термоустойчивым был изолят ВМЦК Д (ТТИ – 65–70 °С), а наиболее стабильным (ТТИ – 85 °С) – изолят ВМЦК 1. Самая высокая концентрация вируса в соке была у изолята ВМЦК 7 (ПРС –  $10^{-6}$ ), а самая низкая – у изолята ВМЦК Р1 (ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ ). У изолятов ВМЦК 6 и ВМЦК 7 инфекционность сохранялась в комнатных условиях в течение 4 сут, в то время как изолят ВМЦК 8 инактивировался в течение 1 сут.

Препараты для электронно-микроскопического исследования с целью определения размера вирусных частиц и морфологии вирионов готовились из очищенных вирусных препаратов и из сока зараженных листьев растений цветной капусты сорта Снежный шар (ВМЦК<sub>0</sub>) и редиса посевного сорта Жара (ВМЦК Р1) с хорошо выраженными симптомами заболевания. Использовали метод погружения и негативного контрастирования 2%-ным уранилацетатом по общепринятой методике, просматривали в электронном микроскопе JEOL JEM 100 S. Для приготовления ультратонких срезов ткань растений фиксировали в 4,5%-ном глютаральдегиде в 0,1М фосфатном буфере, pH 7,1, дополнительно – в 1%-ном тетроксиде осмия, обезвоживали в спирте различной концентрации, ацетоне и заливали Araldit M.

Для обнаружения вирусных включений срезы нижнего эпидермиса инфицированных листьев редиса посевного окрашивали толуидиновым синим и просматривали



при 300-кратном увеличении в световом микроскопе. При изучении ультраструктуры тканей инфицированных вирусом растений цветной капусты были обнаружены сферические частицы диаметром около 50 нм, диффузно рассеянные в гиалоплазме, а также образующие небольшие агрегаты (рис. 3).

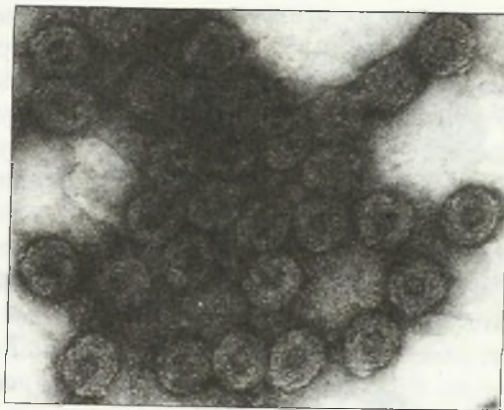


Рис. 3. Электронная микрофотография вируса мозаики цветной капусты (фото Ю.В. Богунова)

Цитоплазматические вирусные включения были обнаружены в цитоплазме инфицированных клеток редиса посевного и цветной капусты. Вирус образовывал округлые внутриклеточные включения, характерные для видов рода каулимовирусов, которые обнаруживались практически во всех исследуемых клетках. Причем их количество в клетке варьировалось от 6 до 12 и располагались они в основном около ядра. Внутриядерных включений обнаружено не было. В ультратонких срезах тканей редиса посевного выявлены большие вирусные агрегаты, образующие типичные Х-тела, которые состояли из электронно-плотного гранулярного матрикса, заполненного вирионами (Богунов, Гнутова, 2004).

Экспериментально было установлено, что вирус передавался тлей персиковой.

Как контрольный тест на возможное присутствие в растениях в качестве смешанной инфекции ВОМ использовалась реакция двойной иммунодиффузии (РДД), которая показывала отрицательный результат с антисывороткой к ВОМ.

**Изолят ВМЦК из дайкона.** В 2006 г. на юге Приморья в теплице среди семенных растений дайкона *Raphanus raphanistroides* сорта Белый клык были выявлены экземпляры с симптомами яркого хлороза жилок на листьях и карликовости растений (Толкач, Гнутова, 2008). Для изучения экспериментального круга растений-хозяев вирусом были инокулированы растения 43 видов и сортов из 8 семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* и *Solanaceae*. Одновременно проверяли на устойчивость к вирусу наиболее популярные в Приморском крае сорта цветной и белокочанной капусты, редиса, репы, редьки и дайкона. На дайконе сортов Дубинушка и Миноваси через 2 недели после заражения проявлялась хлоротичная крапчатость, к концу месяца у сорта Дубинушка наблюдался яркий хлороз жилок (рис. 4), а у сорта Миноваси – зеленая мозаика.

По-разному во время эксперимента реагировали на инфицирование вирусом 15 различных сортов растений редиса посевного *R. sativus*. В эксперименте к заражению вирусом 13 сортов оказались восприимчивыми, причем симптомы варьировались. У сортов Розово-красный с белым кончиком и Красный великан наблюдали хлоротичную крапчатость; от мозаики до яркого хлороза жилок – у сортов Дунканский и Злата; зеленую кольцевую мозаику, хлороз жилок, хлоротичную пятнистость – у сорта



Рис. 4. Лист дайкона (сорт Дубинушка) с симптомами яркого хлороза жилок; слева — лист здорового растения

листа и хлороза всех жилок; растения сорта Гарантия ответили на заражение системным хлорозом, хлоротичной пятнистостью, разбросанной по всей пластинки листа, и ярким хлоротичным окаймлением жилок листа, а у сорта Альфа наблюдали только хлороз жилок. Кроме того, к изучаемому изоляту вируса восприимчивыми оказались турнепс *Br. гара* сорта Остерзундомский, капуста огородная *Br. oleraceae* сорта Белорусская-455, брюква *Br. napobrassica* сорта Далибор, горчица белая *Sinapis alba*. Единственный вид из растений семейства *Brassicaceae* — репа *Br. rapa asiatica* сорта Петровская — был вирусостойчивым.

Характерной особенностью изучаемого изолята ВМЦК Д являлось то, что летом симптомы при высокой температуре (25 °С и выше) маскировались, и симптоматика не соответствовала реальным данным. Поэтому изучение экспериментального круга растений-хозяев проводилось осенью или весной. Еще одной отличительной особенностью изученного изолята ВМЦК Д являлось и то, что он имел довольно узкий круг экспериментально поражаемых растений, причем ограниченный только видами растений семейства крестоцветных. По литературным данным, большинство штаммов этого вируса, кроме растений семейства крестоцветных, заражают растения семейства пасленовых (дурман обыкновенный, табак клевленский, махорку, табак настоящий сортов Ксанти и Самсун) и семейства резедовых, вызывая на этих растениях различные виды симптомов (Garrett, 1982; Schoelz et al., 1986). Но в наших экспериментах неоднократные попытки заразить эти виды растений заканчивались неудачей. Кроме того, дальневосточные изоляты ВМЦК отличались низкой стабильностью по сравнению с известными штаммами этого вируса. Чаще всего у дальневосточных изолятов

Saksa; хлоротичную пятнистость, хлоротичную крапчатость и хлороз жилок — у сорта 18 дней; яркий хлороз листьев и хлоротичную крапчатость — у сорта Илке; хлоротичную пятнистость, зеленую крапчатость и хлороз жилок — у сорта Чайн Роуз Винтер. Вирусостойчивыми оказались лишь два сорта редиса — Французский завтрак и Моховской.

Из трех испытанных сортов редьки *R. sativus* subsp. *hybernus* (Марчел, Маргеланская и Зимняя круглая) на заражение вирусом реагировал только сорт Маргеланская, а сорта Марчел и Зимняя круглая были устойчивыми к вирусу.

Растения цветной капусты сортов Снежный шар, Альфа и Гарантия заражались ВМЦК. У первых реакция на инфицирование проявлялась в виде хлоротичной крапчатости, зеленого окаймления жилок



ВМЦК ПСИ – 1 сут, тогда как многие другие штаммы вируса сохраняют инфекционность в комнатных условиях до двух недель (Garrett, 1982).

Учитывая существенные отличия по биологическим свойствам изученного нами изолята ВМЦК Д от других многочисленных штаммов вируса, известных по литературным данным, в будущем необходимо для объяснения индивидуальных отличий дальневосточного изолята изучить особенности его генома.

Ранее изученные дальневосточные изоляты ВМЦК, как и изолят из дайкона, заражали растения только из семейства *Brassicaceae* (табл. 10). Однако круг растений-хозяев и симптоматология для изолятов были не одинаковы. Наиболее широкий круг поражаемых растений показан нами для изолятов ВМЦК дайкона и цветной капусты. Практически все использованные в эксперименте виды и сорта растений семейства крестоцветных заражались этими изолятами вируса. Менее вирулентным был изолят ВМЦК 6 из белокочанной капусты, который из растений 21 вида заразил 13. Изоляты ВМЦК 8 из белокочанной капусты и редиса (Р1) резко отличались от других довольно ограниченным кругом поражаемых растений. Из растений 21 вида семейства *Brassicaceae* они заразили только 4 и 7 соответственно.

Согласно результатам проведенного нами эксперимента по выявлению вирусостойчивых сортов овощных культур семейства *Brassicaceae*, мы рекомендуем использование в селекционной работе таких сортов редиса, как Французский завтрак и Моховской, редьки сортов Зимняя круглая и Марчел и репы сорта Петровская.

Изучение физических свойств изолята ВМЦК Д показало, что в соке пораженных вирусом растений в комнатных условиях он сохранялся, как и большинство ранее изученных нами изолятов вируса, не более 1 сут. Предельное разведение инфекционного сока, способного заразить тест-растения, соответствовало  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ . Этот результат указывал на низкую концентрацию вируса в растении. ТТИ – 65–70 °С.

В электронном микроскопе обнаружены сферические частицы диаметром 50 нм.

Установлена передача изолята ВМЦК Д тлей персиковой. Был поставлен эксперимент по выявлению возможности передачи изолята вируса семенами зараженных растений. Проверено 80 семян дайкона сорта Дубинушка и 15 семян редиса посевного сорта Саратовский. Растения, выросшие из семян пораженных вирусом растений, выглядели внешне здоровыми, без симптомов вирусного характера. Таким образом, для изучаемого изолята ВМЦК Д, как и для других дальневосточных изолятов вируса, показано отсутствие семенной передачи в естественных и искусственных условиях.

Для получения препарата изолята ВМЦК Д применялась методика, которую использовали для получения ВМЦК<sub>0</sub> (см. ниже). Вирус размножали и накапливали в растениях редиса посевного и дайкона. На 30–35 сут после инокуляции листья этих растений с хорошо выраженными симптомами заболевания использовали для выделения вируса. Полученные препараты вируса обладали типичным нуклеопротеидным спектром поглощения с максимумом при 260 нм и минимумом при 240 нм.  $A_{260/280}$  был 1,3. Полученный препарат изолята ВМЦК Д имел довольно высокую степень чистоты, что было показано методами электронной микроскопии и спектрофотомет-

рически. Из дайкона было выделено около 30 мг/кг ВМЦ, такого высокого выхода для ВМЦКо ранее получить не удавалось. Возможно, это связано с особенностями растения-накопителя (дайкона) или индивидуальными особенностями изолята ВМЦК Д. Препараты вируса использовались в качестве антигена для получения поликлональной антисыворотки. Антиген вводили по схеме, используемой нами ранее для сферических вирусов (Гнутова, 1993). Кроличья антисыворотка имела титр 1:128–1:256 по результатам РДД, была специфичной и имела по результатам КА более высокий титр, чем в РДД.

Таким образом, сравнительный анализ физических свойств показал существенные отличия ВМЦК Д от изучаемых изолятов ВМЦК. Так, он был менее термоустойчив (ТТИ – 65–70 °С), имел низкие показатели ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  и ПСИ – 1 сут, но в то же время отличался высокой иммуногенной и антигенной активностью капсидных белков и довольно в высокой концентрации выделялся из растений дайкона.

Культурные виды растений семейства *Brassicaceae* в ДФО из-за климатических условий не могут вегетировать круглый год, поэтому вероятнее всего ВМЦК при помощи тлей первоначально был перенесен на семенники дайкона с многолетних диких видов растений крестоцветных, пораженных ВМЦК. Из этого следует, что необходимо на ранних этапах развития растений (даже в рассадный период) проводить их регулярные обработки инсектицидами от тлей и обязательно удалять посадки семенников от посадок культурных видов крестоцветных.

**Изолят ВМЦКо из цветной капусты.** При обследовании посадок цветной капусты в Приморском крае были выявлены растения с симптомами хлоротичной мозаики и линейного узора на листьях. У отдельных растений не образовывался цветонос. Для идентификации патогена изучался экспериментальный круг поражаемых растений (табл. 12). Вирусом были инокулированы растения 51 вида и сорта из различных семейств: *Amaranthaceae* Juss., *Brassicaceae* Bunnett, *Chenopodiaceae* Vent., *Cucurbitaceae* Juss., *Fabaceae* Lindl., *Resedaceae* S. F. Gray, *Scrophulariaceae* Juss., *Solanaceae* Juss. Механически удалось заразить вирусом только растения семейства крестоцветных. На растениях цветной капусты *Br. cauliflora* сортов МОВИР и Снежный шар наблюдали симптомы заражения в виде хлоротичной крапчатости, хлороза жилок и дубовидного узора вдоль главной и средней жилок, которые появлялись на 25–30-й день (в зависимости от времени года, температурных условий и освещенности).

Растения редиса посевного сортов Родос, Красный великан, Жара, Илка и Рубин реагировали на инфицирование хлоротичной крапчатостью или хлорозом жилок листа (рис. 5), редиса сортов Базис, Французский завтрак, Саратовский и Розово-красный с белым кончиком оказались устойчивыми к заражению.

Не все испытанные сорта дайкона одинаково реагировали на заражение. Не восприимчивыми к патогену являлись сорта Розовый блеск и Японский ранний. Остальные сорта отвечали на инфицирование ВМЦК крапчатостью, хлорозом жилок листа (сорта Шогоин, Зеленый), посветлением жилок (сорта Белый клык, Миясиге).

Растения репы сорта Петровская реагировали на заражение ВМЦКо ярким хлорозом жилок, деформацией листа, который, как правило, закручивался вниз. Растения



## Реакция тест-растений на заражение изолятом из цветной капусты (ВМЦКо)

Тест-растения	Симптомы поражения
<i>Alyssum saxatile</i> L., cv. Citrinum	—
<i>Amaranthus blitum</i> L.	—
<i>Am. caudatus</i> L.	—
<i>Am. cruentus</i> L.	—
<i>Antirrhinum majus</i> L.	—
<i>Brassica cauliflora</i> (Mill.) Litzg., сорта: МОВИР	S: CIMot, CIve, BdVe
Снежный шар	S: CIMot, CIve, BdVe
<i>Br. juncea</i> (L.) Czern.	S: CIve, Dis
<i>Br. nigra</i> Koch.	—
<i>Br. oleracea</i> L., сорта: Июньская	—
Лосиноостровская	—
Московская	—
Слава	—
<i>Br. rapa</i> L., сорт Петровская	S: CIve, Dis
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	—
<i>Ch. ambrosoides</i> L.	—
<i>Ch. murale</i> L.	—
<i>Cucumis sativus</i> L., сорта: ДВ-6	—
ДВ-27	—
Миг	—
<i>Cucurbita pepo</i> var. patisson Duch.	—
<i>Hesperis matronalis</i> L.	—
<i>Gomphrena globosa</i> L.	—
<i>Iberis amara</i> L.	—
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., сорта: Невский	—
Хабаровский	—
<i>Matthiola incana</i> R. Br.	S: CIMot, Dis
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	—
<i>N. rustica</i> L.	—
<i>N. sylvestris</i> Speg. et Comes	—
<i>Ocimum basilicum</i> L.	—
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	—
<i>Reseda odorata</i> L.	—
<i>Raphanus raphanistroides</i> (Makino) Sinsk,	S: CIve
сорта: Белый клык	S: Mot, CIve
Зеленый	—
Мясисте	—
Розовый блеск	—
Шогоин	S: CIve

Тест-растения	Симптомы поражения
<i>R. sativus</i> L., сорта: Базис	—
Жара	S: CIMot
Илка	S: CIMot
Красный великан	S: CIMot
Родос	S: CIMot
Розово-красный с белым кончиком	—
Саратовский	—
Французский завтрак	—
<i>Sinapis alba</i> L.	S: CIVe, CIM
<i>S. arvense</i> L.	S: CIVe, CIM
<i>Sisymbrium officinalis</i>	—
<i>Spinacia oleracea</i> L.	—

маттиолы седой *Matthiola incana* заражались не всегда, но если заражение происходило, то на листьях наблюдали хлоротичную крапчатость и деформацию.

У капусты огородной используемые в эксперименте сорта Июньская, Лосиноостровская, Московская и Слава оказались устойчивыми к изучаемому вирусу. Из дикорастущих растений семейства крестоцветных вирусом смогли заразить только растения трех видов горчицы — полевой *Sinapis arvense*, белой *S. alba* и сурепской *Br. juncea*.

Однако экспериментально изучаемым изолятом ВМЦК некоторые растения семейства крестоцветных не заражались, например чесночница лекарственная *Sisymbrium officinalis*, черная французская горчица *Brassica nigra*, стенник зонтич-



Рис. 5. Симптомы поражения растений редиса (слева) и лобы (справа) вирусом мозаики цветной капусты



ный *Iberis amara*, вечерница матроны *Hesperis matronalis*, бурачок скальный *Alyssum saxatile* cv. Citrinum. Из других семейств ВМЦК не заражал растения: амарант голубой *Amaranthus cruentus*, марь амброзиевую *Chenopodium ambrosioides*, марь амарантоцветную *Ch. amaranticolor*, базилик *Ocimum basilicum*, дурман обыкновенный *Datura stramonium*, львиный зев *Antirrhinum majus*, гомфрену головчатую *Gomphrena globosa*, огурец посевной сортов *Cucumis sativus* ДВ-6, ДВ-27, патиссон *Cucurbita pepo* var. patisson, петунию гибридную *Petunia hybrida*, резеду *Reseda* sp., табак настоящий *N. tabacum* cvs. Samsun, Xanthi, табак лесной *N. sylvestris*, табак клейкий *N. glutinosa*, томат съедобный *Lycopersicon esculentum* сортов Невский, Хабаровский, шпинат огородный *Spinacia oleracea*.

Изучение физических свойств ВМЦКо показало, что в соке пораженных растений при комнатных условиях вирус сохраняется 1 сут, ПРС составляет  $10^{-4}$ , ТТИ – 80 °С.

Для получения препарата ВМЦКо была использована методика Морриса с соавт. (Morris et al., 1980) в небольшой нашей модификации. Вирус накапливали в растениях редиса посевного и листья растений с хорошо выраженными симптомами заболевания использовали на 30–35 сут после инокуляции. Гомогенизацию материала проводили в 0,5 М калийно-фосфатном буфере, pH 7,5, с добавлением 0,2% 2-меркаптоэтанола и 0,005 % ЭДТА. Первичное осветление осуществляли с помощью смеси хлороформа и бутанола (27% и 7% соответственно) с последующим центрифугированием при 4000 g. Концентрировали вирус полиэтиленгликолем (м.м. 6000) в присутствии 0,1 NaCl (в течение ночи при 4 °С). Дальнейшую очистку проводили, используя один цикл дифференциального центрифугирования (осаждение – 95000 g, последующие экстракции – 3000 g). Затем в препарат добавляли хлороформ до 1% и через сутки осветляли вирусосодержащую жидкость низкоскоростным центрифугированием.

Концентрацию вируса в препарате и качество полученных вирусных препаратов определяли спектрофотометрически.  $A_{260/280}$  был 1,3. Вирусные препараты имели типичный нуклеопротеидный спектр поглощения с максимумом при 260 нм и минимумом при 240 нм. Максимальный выход вируса составил 6 мг/кг (из растений редиса), что соответствовало литературным данным (Hull et al., 1976; Shepherd et al., 1980). Препараты использовали для изучения морфологии вирусных частиц, свойств вирусспецифических белков и нуклеиновой кислоты ВМЦКо, а также для получения Ас.

В препарате ВМЦКо выявили только два белка с близкими м.м. – 42 и 44 кДа. Доказательством того, что данные полипептиды имели вирусную природу, служил анализ белков сока неинфицированного ВМЦК растения того же сорта, в которых накапливали вирус для очистки. Было показано, что в соке здоровых растений эти белки отсутствовали (Богунев, 2004). Молекулярные массы вирусспецифических белков (42, 44 кДа) лежали в диапазоне 37–44 кДа, что, как показано рядом исследователей, характерно для белка оболочки ВМЦК (Ani et al., 1980; Gong et al., 1990). О степени очистки вирионов по используемой методике служили данные электрофоре-

за. На электрофореграммах, полученных авторами, отсутствовали белковые зоны, лежащие в диапазоне м.м. 55–100 кДа, образующиеся *in vivo* в ходе репликации ВМЦК (55 кДа – основной белок вирусных включений, 58–62 кДа – предшественник белка оболочки вириона и белок с м.м. 67 кДа, который является димером основного структурного белка). Описаны случаи присутствия перечисленных белков в препаратах ВМЦК при некачественной очистке (Hahn, Shepherd, 1982).

Наличие не одного, а двух белков с очень близкими м.м. на электрофореграмме препарата ВМЦКо предположительно можно объяснить протеолитическим распадом вирионного белка. Burger и Du Plessis (1981) показали, что в ходе очистки белок оболочки 58 кДа деградирует с образованием двух полипептидов 44–43 и 37 кДа, причем такая модификация основного белка ВМЦК происходит не только при получении препарата, но и *in vivo* – в клетках растения. Однако более надежные сведения о происхождении дополнительного компонента можно получить с помощью моноклональных антител, полученных к основным вирусным белкам. Необходимо также отметить, что в зависимости от условий выделения вируса и от его штамма спектр белков препарата ВМЦК может значительно различаться. Так, R. Hull с соавт. (1976) в препарате Cabб-В выявили два полипептида с м.м. 33 и 37 кДа, а также их димеры с м.м. более 60 кДа. Штамм СМ-184, считающийся одним из наиболее стабильных, на электрофореграмме давал одну зону, соответствующую белку с м.м. 44 кДа (Hahn, Shepherd, 1982).

Второй компонент вируса – нуклеиновая кислота. Ее характеристика является важнейшим таксономическим признаком каулимовирусов. В связи с этим был отработан метод экстракции н.к. из вирионов ВМЦКо, и с помощью электрофоретипирования были получены профили, характерные для генома ВМЦК. В дополнение к этому методом ферментативного гидролиза была подтверждена дезоксирибонуклеиновая природа обнаруженных фрагментов. Это позволило однозначно отнести изучаемый изолят к вирусу семейства *Caulimoviridae*, так как все известные на сегодняшний день двухцепочечные ДНК-геномные вирусы растений объединены в это семейство (Краев, 2000). Знание размера генома имеет меньшую информативность для идентификации вируса, так как даже в пределах рода *Caulimovirus* длины геномов у разных видов могут совпадать. И все же отметим, что ДНК изучаемого вируса имеет длину около 8 т.п.н., что соответствует размеру генома ВМЦК (Богунов, 2004).

Очищенные препараты ВМЦКо использовались в качестве иммуногена для получения поликлональных кроличьей и крысиной антисывороток. Кроличья поликлональная антисыворотка имела титр 1:128 по результатам РДД. Кроме кроличьей, была получена пробная партия специфической крысиной антисыворотки против изучаемого изолята вируса. Антиген вводили внутривентально по следующей схеме иммунизации: 1-й день – 150 мкг антигена с полным адьювантом Фрейнда; 7-й, 14-й дни – по 200 мкг; 21-й день – первое взятие крови. Антисыворотка была специфичной и имела титр в реакции капельной агглютинации – 1:65536.

Таким образом, полученные данные по изучению экспериментального круга растений-хозяев дальневосточного изолята ВМЦКо, симптоматиологии поражаемых



растений, физических свойств вируса, морфологии и размеров вирусных частиц, возможности передачи вируса тлями, наличия в клетках инфицированных растений округлых внутриклеточных включений, характерных для вирусов рода каулимовирусы, а также некоторых физико-химических и антигенных свойств капсидных белков позволили сделать заключение о том, что вирус, выделенный из растений цветной капусты, ближе всего по своим свойствам к обычному штамму ВМЦК. Но, учитывая существенные отличия по биологическим свойствам изученного нами изолята ВМЦК от многочисленных штаммов этого вируса, известных в литературе, считаем его дальневосточным штаммом ВМЦК с индивидуальными свойствами (Gnutova et al., 2002). Он имел довольно узкий круг экспериментально поражаемых растений, причем ограниченный только видами растений семейства крестоцветных. По литературным данным, большинство штаммов этого вируса кроме растений семейства крестоцветных заражают растения семейства пасленовых (дурман обыкновенный, табак клевленский, махорку, табак настоящий сортов Ксанти и Самсун) и семейства реzedовых, вызывая на этих растениях различные виды симптомов (Garrett, 1982; Schoelz et al., 1986). В наших экспериментах неоднократные попытки заразить эти виды растений заканчивались неудачей. Дальневосточный изолят ВМЦК имел ПСИ – 1 сут, тогда как у многих других штаммов этот показатель – до 2 недель (Garrett, 1982).

Световая и электронная микроскопия в клетках растений цветной капусты и редиса посевного, зараженных штаммами ВМЦК, позволила обнаружить цитоплазматические включения со сферическими частицами диаметром около 50 нм, что характерно для вирусов рода *Caulimovirus*. Патологические изменения в ядрах не обнаружены, хотя в литературе описаны штаммы, которые образуют небольшие внутриядерные агрегаты вирионов (Богунов, 2004; Bassi et al., 1974). Мембранная система пластид в клетках пораженных изучаемыми штаммами ВМЦК растений также не содержала цитопатологических изменений. В них не обнаружены вирионы, которые наблюдали Т.А. Шала с соавт. (Shalla et al., 1982).

Результаты сравнительного изучения биологических свойств шести природных изолятов вируса позволяли предположить, что для ВМЦК, циркулирующего в крае, характерна высокая генетическая изменчивость. Мы попытались изучить генетическую изменчивость российских дальневосточных изолятов ВМЦК, чтобы пополнить наши знания о видовом разнообразии этого вируса, его географической привязанности, а также разработать методы его диагностики на молекулярной основе (Богунов, Гнутова, 2002; Богунов, 2004; Богунов, Гнутова, 2005). В ряде зарубежных исследований было показано, что изоляты (штаммы) ВМЦК, собранные в различных регионах мира и имеющие биологические особенности, отличаются характерными (индивидуальными) профилями рестрикции при расщеплении ферментами их ДНК (Hull, Howell, 1978; Hull, 1980). Однако мы решили, что большей информативности можно достичь при использовании метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДФ) в сочетании с ПЦР. Это позволяло сравнивать изоляты непосредственно

по тем последовательностям ДНК, которые отвечают за их фенотипические особенности. За счет использования «мелкощепящих» рестриктаз ПЦР-ПДФ анализ стал более детальным. Такой подход обоснован был тем, что ранее обнаруженные фенотипические различия между изолятами должны были иметь отражение в нуклеиновой последовательности ДНК штаммов вируса. Нами был проанализирован не в целом геном изолятов, а только участок ДНК ВМЦК, кодирующий белок цитоплазматических вирусных включений (ОРС VI). Он, как было установлено ранее зарубежными исследователями, является одним из основных факторов развития штаммоспецифичных симптомов вирусной инфекции (Zijlsra et al., 1996; Gery et al., 1999) и способен определять специфичность изолята по отношению к кругу поражаемых растений (Schoelz et al., 1986).

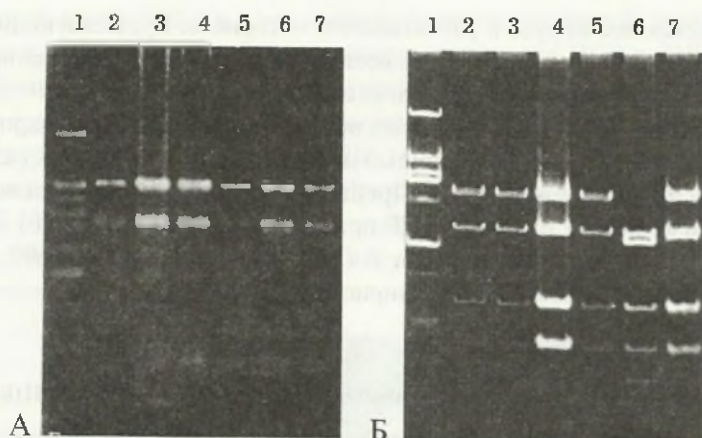
Несмотря на то что с помощью рестрикционного анализа учитывалась лишь малая доля нуклеотидных замен, этот метод оказался чрезвычайно информативным и в большинстве случаев позволял зарубежным авторам выявлять внутривидовую изменчивость ВМЦК (Meagner et al., 1977; Hull, Howell, 1978; Hull, 1980). В 1986 г. Schoelz с соавт. описали изолят D4, системно поражающий не только крестоцветные, но и растения из семейства пасленовых. С помощью ПДФ-анализа были продемонстрированы существенные отличия генетической карты данного штамма от карт геномов ранее описанных штаммов.

ДНК изолятов ВМЦК выделяли из вирусных препаратов и использовали в качестве матрицы для амплификации. В ПЦР использовали специально сконструированные олигонуклеотидные праймеры, структура которых была подобрана на основе известных нуклеотидных последовательностей вируса. Были амплифицированы нуклеотидные последовательности, представляющие собой полноразмерные копии гена VI всех изучаемых изолятов. Ампликоны были обработаны 9 рестриктазами, 7 из которых являлись частощепящими.

Известно, что полиморфизм ДНК вызывается либо точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, либо ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций. Для штаммов одного вида вируса анализ фрагментов ДНК, полученных при использовании рестриктаз типа *TaqI*, позволяет оценить сходство геномов по числу общих (идентичных) фрагментов в их составе (Алтухов, Салменкова, 2002). Проведенный нами анализ генетической изменчивости дальневосточных изолятов ВМЦК показал, что для пяти из них (ВМЦК<sub>0</sub>, ВМЦК 1, ВМЦК P1, ВМЦК P2, ВМЦК 7) характерна 100% степень сходства по данным ПДФ-анализа. Отличия в нуклеотидной последовательности (одна нуклеотидная замена) обнаружены только для ВМЦК 6.

Полученные данные свидетельствуют о том, что между всеми изучаемыми изолятами (ВМЦК<sub>0</sub>, ВМЦК 1, ВМЦК P1, ВМЦК P2, ВМЦК 6, ВМЦК 7, ВМЦК 8) не удалось обнаружить существенных отличий в последовательности участка генома, кодирующего указанные выше признаки. Из 33 выявленных сайтов рестрикции только один оказался полиморфным (рис. 6).





**Рис. 6.** ПДРФ-профили ГБЦВ дальневосточных изолятов ВМЦК (фото Ю.В. Богунова). 1 – 100 bp+1,5 Кб ДНК, 2 – ВМЦКo, 3 – ВМЦК1, 4 – ВМЦК P1, 5 – ВМЦК P2, 6 – ВМЦК6, 7 – ВМЦК7. А – TaqI (2%-ный агарозный гель), Б – HpaI (5%-ный ПААГ)

Данные по рестрикционному анализу позволили нам обсуждать результаты только по ВМЦКo – обычному дальневосточному штамму. Тем не менее выявленные даже небольшие различия между дальневосточными изолятами, проявляющиеся в отсутствии сайта рестрикции у одного изолята (ВМЦК 6), уже свидетельствовали о наличии генетической вариабельности в популяции ВМЦК, циркулирующей на юге ДФО. Поэтому было интересно исследовать изменчивость дальневосточных изолятов не только между собой, но и сравнить их с зарубежными. Метод ПДРФ с присущими для него ограничениями все-таки позволяет это сделать. На основе известных нуклеотидных последовательной ОРС VI ВМЦК реконструировали рестрикционные карты 12 зарубежных штаммов, которые сравнили с данными, полученными для дальневосточных изолятов ВМЦК (Богунов, 2004). Автором показано, что российские изоляты ВМЦК чаще всего характеризовались уникальными наборами рестрикционных фрагментов. Обобщая полученные данные, мы предполагаем, что вирус представляет специфическую, но достаточно однородную популяцию, обособленно существующую на данной территории. Это одно из объяснений столь существенных отличий дальневосточных российских изолятов ВМЦК от зарубежных. Более обстоятельно генетические и филогенетические взаимоотношения зарубежных и дальневосточных штаммов можно будет исследовать только после секвенирования последних.

**ПЦР-диагностика ВМЦК.** Таксономическая принадлежность ВМЦК была установлена путем сравнения литературных данных и изученных нами биологических, физико-химических и антигенных свойств патогена. Идентификация ВМЦК в растении с признаками вирусного поражения – работа кропотливая, трудоемкая и занимающая достаточно продолжительное время (от нескольких месяцев до года). Поэтому требовался метод, позволяющий достаточно быстро и с высокой точностью

производить детекцию вируса в растительном материале. Существующие коммерческие диагностические тест-системы не всегда отвечают этим требованиям. Для этих целей нами была разработана ПЦР-диагностика.

В работе использовали листья редиса пораженного ВМЦК. Суммарную ДНК выделяли из 50 мг листовой ткани с помощью набора для выделения ДНК («Лаборатория Медиген», Россия) и СТАВ-буфера по Дрейперу и растворяли в 50 мкл воды. Для выявления вируса в листьях растений ПЦР проводили в термоциклере T3 Thermocycler («Biometra», Германия). Праймеры F и R (табл. 13) фланкируют ~600 п.н. IV гена ВМЦК, кодирующего белок оболочки вириона.

Таблица 13

#### Характеристика праймеров, использованных для детекции ВМЦК

Праймер	Последовательность 5' – 3'	Длина, п.н.	Температура отжига, °С	Длина ампликона, п.н.
F	TTTAAGCGGGGCTTAATCGGA	22	48,72	600
R	ATTCATTTGGAGAGGACACGC	22	47,83	

Праймеры подбирались и конструировались как на основании депонированных в GenBank нуклеотидных последовательностей фрагмента (табл. 14), так и включающих данный фрагмент генома ВМЦК с помощью программы Mega.

Таблица 14

#### Праймеры из Gen Bank к гену белка оболочки ВМЦК

Штамм	Страна, предоставившая штамм вируса в базу NCBI	Номер в базе NCBI
BBC	США	M90542
Cabb-D/H	Венгрия	M10376
Cabb-S	Италия	V00141
CW1841	США	V00140
CMV-1	США	M90543
NY 8153	США	M90541
B29	Франция	X79465
NC001497	США	NC 001497
Xinjing	Китай	AF140604

ПЦР проводили с использованием набора для амплификации с Taq-полимеразой (ООО «СибЭнзим», Россия) в объеме 25 мкл, содержащего 4 мкл анализируемой ДНК, 10 пМ каждого праймера, 1 мкл dNTPmix (0,5 мМ каждого), 2,5 мкл 10X буфера и воды до 25 мкл. Условия амплификации: 94 °С – 3 мин; 35 циклов: 94 °С – 1 мин, 48 °С – 1 мин, 72 °С – 50 сек, 72 °С – 5 мин – общая элонгация.

Электрофоретический анализ продуктов проводили в 0,8%-ном агарозном геле. Оптимизированные условия обеспечивали амплификацию единственного фрагмен-



та ДНК длиной около 600 п.н., что соответствовало расчетной величине (рис. 7). Специфичность праймеров F и R изучали при постановке ПЦР с ДНК, выделенной из неидентифицированных (здоровых) растений семейства крестоцветных, в которых упомянутый фрагмент не обнаружен, а также с ДНК ВМЦК, выделенной по методу, предложенному R. Richins, R. Shepherd (1983), где полученный нами ампликон соответствовал расчетной величине. Таким образом, подтверждена специфичность праймеров F и R к гену белка оболочки ВМЦК и возможность использования их в качестве ПЦР-диагностикума для идентификации вируса мозаики цветной капусты в инфицированных растениях.

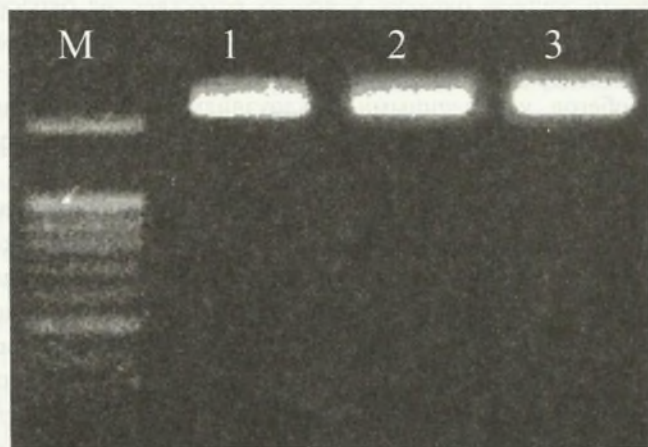


Рис. 7. Электрофореграмма распределения продуктов амплификации с праймерами F и R для диагностики ВМЦК (фото И.Б. Несмелого). М – м.м. маркеров 1,0 Кв Ladder, 1 – ампликон с ДНК ВМЦК, 2 – с суммарной ДНК, выделенной при помощи набора для выделения ДНК из листьев редиса, инфицированного ВМЦК («Медиген», Россия), 3 – с суммарной ДНК, выделенной при помощи СТАВ-буфера из инфекционных ВМЦК листьев редиса

Итак, на юге ДФО выявлены изоляты ВМЦК на культурных растениях семейства крестоцветных – редиса, цветной и белокочанной капусте, дайконе. Современный подход в изучении штаммов ВМЦК требовал опираться в исследованиях не только на комплекс классических методов идентификации, но и на методы молекулярной биологии, поскольку все фенотипические особенности изолятов генетически детерминированы.

### Вирус мозаики георгины *Dahlia mosaic virus*

Вирус мозаики георгины (ВМГе) имеет изометрические частицы диаметром около 50 нм (Макутенайте-Навалинсене, 1981). Описан в 1928 г. (Brandenburg, 1928, цит. по: Brunt, 1971).

**Биологические свойства.** *Круг растений-хозяев и симптоматология.* Естественная инфекция обнаружена только у видов *Dahlia*, но вирус может инфицировать растения семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Solanaceae* (Brunt, 1971). При заражении одних сортов вирус вызывал хлоротические пожелтения жилок листьев и их искривления; у других, наиболее чувствительных к заражению, — приостановку роста; у третьих, менее восприимчивых, — латентную инфекцию. У большинства сортов пораженных вирусом растений ткань листьев, окаймляющая среднюю и боковые жилки, имеет зеленовато-желтую окраску. В зависимости от сорта георгин форма и ширина окаймлений бывает различной. У одних сортов листья имеют почти желтую окраску, у других естественная окраска сохраняется, однако они становятся деформированными, морщинистыми, с пузырчатыми вздутиями. Отмечены также растения, имеющие карликово-кустистый вид со множеством боковых побегов, укороченными междоузлиями с мелкими мозаичными листьями. Цветonoсы сильно укорочены, иногда наблюдалась деформация цветков (Макутенайте-Навалинскене, 1981).

К диагностическим видам относят следующие растения. Георгина *Dahlia pinnata*. На растение вирус легко переносится тлями, с трудом — механической инокуляцией сока. Через 3 недели после заражения наблюдается пожелтение жилок, общий хлороз, задержка роста. У растения агатарум *Ageratum coryzoides* cv. Blue Bal вирус вызывал некрозы диаметром 2–4 мм на 10–20 сут после заражения с последующим системным хлорозом. Вербена *Verbesina encelioides* — одно из лучших тест-растений для накопления вируса при получении очищенного препарата. На инокуляцию вирусом растение реагирует некрозами (в диаметре 2–4 мм) через 10–15 сут, особенно четко реакция проявляется в условиях короткого дня. Затем наблюдается общий хлороз и легкое скручивание инфицированных листьев. У растений циннии изящной *Zinnia elegans* и амаранта (щирица хвостатая) *Amaranthus caudatus* на 10–14 сут образуются некрозы диаметром 1–2 мм с последующей слабой системной реакцией.

Физические свойства вирионов: ТТИ — 75–80 °С, ПРС —  $10^{-3}$ , ПСИ — 2 сут (Brunt, 1971); ТТИ — 85 °С, ПРС —  $10^{-3}$  (Макутенайте-Навалинскене, 1981).

Георгина и все системно инфицируемые растения содержат в цитопазме сферические и эллипсоидные включения, очень сходные с теми, что индуцирует ВМЦК (Rabio-Huertos et al., 1968).

В природе вирус распространяется непersistентным способом несколькими видами тлей (*Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphorbiae*), прививкой, соком — с трудом. Сохраняется в клубнях больных растений и распространяется при их вегетативном размножении. Перенос вируса семенами и повеликой не зарегистрирован.

Ранее был обнаружен в Литве и в России в коллекции ГЭС РАН.

**Антигенные свойства.** ВМГе — хороший иммуноген. Антисыворотка получает с высоким титром специфических антител, но из-за низкой концентрации вируса в соке растений часто иммунодиагностика КА не удается. Отмечено антигенное родство ВМГе с ВМЦК. Антисыворотки к этим вирусам мало отличаются по характеру в гомологичных и гетерологичных реакциях в РДД. Однако, несмотря на эти близкие



антигенные свойства и другие общие свойства, вирусы по кругу растений-хозяев не совпадают и инфицируют различные растения-хозяева.

ВМГе выявлен на растениях георгины с симптомами яркого хлороза и слабой листовой деформацией в Ботаническом саду-институте ДВО РАН г. Владивостока (Tolkach, Gnutova, 2000). Для определения круга поражаемых растений вирусом инокулировали растения 38 видов и сортов из семейств *Aizoaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Восприимчивыми к вирусу оказались растения 10 видов и сортов из семейств *Aizoaceae* (*Tetragonia expansa*) и *Chenopodiaceae* (*Chenopodium amaranticolor* и *Ch. murale*), *Asteraceae* (*Dahlia pinnata*; *Zinnia elegans*) и *Solanaceae* (*N. tabacum* cvs. Xanthi, Samsun; *N. rustica*; *Petunia hybrida*; *Verbesina enceloides*).

Симптомы на разных сортах георгин проявляются по-разному: чаще всего в виде пожелтения участков вдоль жилок листа, иногда отмечается асимметрия роста половинок листа и пузырчатость листьев. На некоторых сортах происходит укорачивание междоузлий. Отдельные сорта являются бессимптомными носителями вируса. Диагностическим видом является вербена. Характерный симптом – сворачивание листьев краями вниз через 10 сут после инокуляции; позже появляется посветление жилок, а спустя месяц – желтые участки вдоль жилок. Цинния изящная реагирует на вирус карликовостью с заметным закручиванием листьев вниз; агератум – хлоротичными некрозами и системным хлорозом жилок и листьев; ширица хвостатая – хлоротичными некрозами и системной пятнистостью листьев. В эпидермисе листьев георгины вирус образует внутриклеточные включения (Билай и др., 1988).

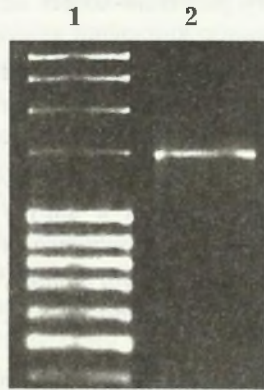
Определены физические свойства дальневосточного изолята ВМГе. ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-4}$ , ПСИ – 6 сут.

Дальневосточный изолят вируса передавался механически и тлей *M. persicae*.

По биологическим свойствам изучаемый изолят ВМГе незначительно отличался от изолятов ВМГе, описанных в литературе, и не имел сходства с известными вирусами, поражающими георгины, – кукумовирусом огуречной мозаики *Cucumber mosaic cucumovirus*, X-вирусом картофеля *Potato virus X* из рода *Potexvirus*, тосповирусом бронзовости томата *Tomato spotted wilt tospovirus* (синоним – вирус пятнистого увядания томата), иларвирусом полосатости табака *Tobacco streak ilarvirus* и др. (Brunt, 1971; Kameya-Iwaki, 1998).

В РДД инфекционный сок (исходный образец) с антисывороткой против ВОМ не реагировал, что свидетельствовало о моноинфекции. Кроме того, дальневосточный изолят ВМГе в РДД показал антигенное родство с антисывороткой против ВМЦК.

Для детекции дальневосточного изолята ВМГе использовали ПЦР (Богун, 2006). Установлено, что для выделения ДНК из листьев георгины наилучшие результаты показал метод гомогенизации листьев в жидком азоте с последующей очисткой цетилтриэтиламонийбромидом. О положительном результате (присутствие ДНК ВМГе в образце) свидетельствовали треки при постановке электрофореза длиной ~1440 п.н. при амплификации с праймерами 1D-F-1D-R (рис. 8).



**Рис. 8.** Амплификация гена белка оболочки ВМГе (фото Ю.В. Богунова). 1 – ДНК-маркер MassRull (Fermentas), 2 – ПЦР-продукт, полученный при использовании тДНК ВМГе и праймеров 1D-F-1D-R

Для доказательства специфичности амплифицируемых фрагментов был разработан вариант гнездовой ПЦР с праймерами 2D-F (5'-AAAGAACATCAACTTAGTAGCC-3') и 2D-R (5'-GCTTGGGCCTAGTATATTTC-3'). Амплифицированный фрагмент (локализация 843–1165 последовательности AY291588) длиной 323 п.н. был секвенирован (регистрационный номер в GeneBank AY971810) и сравнен с таковым из GeneBank. Гомология с последовательностью AY291588 составила 97,7%, что свидетельствовало об амплификации ДНК ВМГе. Предложенная система детекции генома ВМГе была использована для скрининга вируса в естественно-зараженных растениях георгины, выявленных в результате ежегодного мониторинга, проводимого в различных регионах ДВ в 2004–2005 гг. Исследовано 55 образцов, в 12 показано присутствие ДНК ВМГе. Результаты скрининга свидетельствуют о распространении вируса на юге ДФО, особенно в Приморском крае. В растениях георгин из Хабаровского края ВМГе не был обнаружен.

*Секвенирование гена белка оболочки вируса мозаики георгины.* Учитывая, что ВМГе один из мало изученных вирусов рода *Caulimovirus*, а также то, что он достаточно широко распространен на территории Приморского края, сделана попытка определить нуклеотидные последовательности местных изолятов вируса. Секвенировать полноразмерную ДНК ВМГе на сегодняшний день не представляется возможным из-за отсутствия препарата вируса. Однако методом прямого секвенирования можно определить последовательности, гомологичные депонированным в GeneBank. На сегодняшний день известна лишь одна последовательность,

Таблица 15

**Праймеры, используемые для секвенирования ВМГе**

Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
D 1F	TGG-CCT-CCA-GTA-TGA-AAG	359
D 1R	GTG-GCT-GGT-CAT-CAT-CG	
D 2F	ACA-ACT-GGA-ACA-TCA-GGG	379
D 2R	TGT-ACA-AGC-CTT-TGG-TGG	
D 3F	GGT-CCT-TGA-TGA-AGC-CAC	420
D 3R	TTG-GGC-TCT-TTG-TAC-TGG	
D 4F	GAA-ATT-GCT-AAG-TAT-TGC-G	466
D 4R	TAT-TCT-GTT-CCT-GAT-GAT-TC	



представляющая ген белка капсидной оболочки ВМГе (AY291588). Комплементарно последней подбирали 4 пары праймеров для амплификации гена в виде 4-х перекрывающихся фрагментов (табл. 15).

Сконструированные праймеры позволили амплифицировать четыре фрагмента расчетной длины (рис. 9).

Распространен ВМГе по всему миру, где выращиваются георгины, в том числе, как впервые показали наши исследования, и в России в ДФО.

Таким образом, за последние 10 лет в ДФО помимо типового представителя рода *Caulimovirus* – вируса мозаики цветной капусты идентифицирован еще один ДНК-геномный вирус – мозаики георгины *Dahlia mosaic virus*, который по изученным свойствам отнесен так же, как и ВМЦК, к роду *Caulimovirus* семейства *Caulimoviridae*.

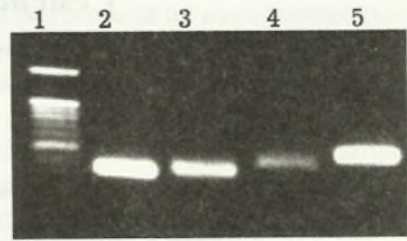


Рис. 9. Амплификация гена белка оболочки изолята ВМГ (фото Ю.В. Богунова). 1 – ДНК маркер 100 bp+1,5 Kb, ПЦР-продукты, полученные с праймерами: 2 – D1F-D1R, 3 – D2F-D2R, 4 – D3F-D3R, 5 – D4F-D4R

---

## Семейство Rhabdoviridae

---

Семейства рабдовирида *Rhabdoviridae*, парамиксовирида *Paramyxoviridae* и филовирида *Filoviridae* входят в состав порядка *Mononegavirales*. Название семейства рабдовирида происходит от греческого слова *rhabdo*, означающего стержень, палочка.

### Таксономическая структура семейства

#### Роды:

<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>Lyssavirus</i>
<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Ephemerovirus</i>
<i>Vesiculovirus</i>	<i>Novirhabdovirus</i>

Из шести родов, входящих в семейство *Rhabdoviridae*, мы дадим характеристику лишь двум – *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus*, в которые входят вирусы растений. Название первому роду дало греческое слово *cytos* (клетка); в названии второго *nucleo* – от латинского *nux, nucis* – орех, ядро. За основу образования этих двух родов выбраны места созревания вирусных частиц: в цитоплазме для рода *Cytorhabdovirus* и в ядре для рода *Nucleorhabdovirus*. Однако для ряда рабдовирусов растений, пока еще не отнесенных к какому-либо роду семейства, этот критерий может оказаться недостаточным. В настоящее время, по данным МКТВ, насчитывается около сотни рабдовирусов растений, изученные свойства которых пока не позволяют отнести их к определенному роду (Fauguet et al., 2005). Характеристика семейства *Rhabdoviridae*, включающего свойства фиторабдовирусов родов *Cytorhabdovirus* и *Nucleorhabdovirus*, цитируется в основном по: П.Ю. Мамаев, 1998; В.Г. Краев, 2001.

**Свойства вирионов.** Вирионы длиной 100–430 нм и диаметром 40–100 нм. Вирусы растений, относящиеся к этому семейству, в большинстве своем бациллоидной формы, когда частица закруглена с двух концов, если они зафиксированы перед негативным окрашиванием; в незафиксированных препаратах частицы могут приобретать пулевидную форму, когда один конец частицы круглый, а другой усеченный, либо могут быть плеоморфными, то есть бациллоидными. Некоторые вирусы растений, которые предположительно относят к семейству *Rhabdoviridae*, лишены оболочки. Внешняя поверхность вирионов бациллоидной формы покрыта выростами (пепломерами) высотой 5–10 нм и в диаметре порядка 3 нм, образованными вирусным гликопротеином. Внутренний нуклеокапсид диаметром 30–70 нм имеет спиральную структуру и виден на поперечно срезанных и негативно окрашенных вирусных частицах. Он состоит из комплекса РНК с белками N, NS(M1) и окружен липидной оболочкой, содержащей белок M (M2). Для нуклеокапсида характерна транскриптазная активность. В раскрученном состоянии он представляет собой волокно длиной 700 нм, диаметром 20 нм.



Характерной чертой рабдовирусов является формирование их из палочковидных структур и образование крупных скоплений вирионов, окруженных общей мембраной ядерного или цитоплазматического происхождения. Палочковидная структура (нуклеокапсид вириона) формируется из вироплазм, представляющих собой электронноплотные области, образованные гранулами и спиральными стержнями (Федотина, Атабеков, 1980; Brown, Newcomb, 1987). Рабдовирусы имеют наиболее сложную по морфологии и содержанию частицы из всех известных вирусов. Они содержат 70% белка, 25% липидов, 4% полисахаридов и 1% РНК (Francki et al., 1985).

*Физико-химические и физические свойства.* Вирусы этого семейства (-)онРНК имеют м.м. вирионов – 300–1000 кДа,  $S_{20,w}$  у рабдовирусов растений – 550–1045 S и выше. Плавающая плотность в CsCl – 1,19–1,20 г/см<sup>3</sup>, в сахарозе – 1,17–1,19 г/см<sup>3</sup>. Вирусы сохраняют инфекционность в диапазоне pH 5–10, быстро инактивируются при 56 °C и после действия УФ- и X-лучей или контакта с растворами липидов.

*Нуклеиновая кислота.* Одна молекула линейной онРНК(-) имеет м.м. 4,2–4,6 мДа (около 11–15 т.п.о.). РНК составляет 1–2% массы вирусной частицы. РНК имеет 5'-концевой трифосфат и не полиаденилирована. Концы РНК включают инвертированные комплементарные последовательности.

*Белки.* Вирусы растений семейства *Rhabdoviridae*, как правило, имеют 5 полипептидов. Белок L (220–240 кДа) – компонент вирусного нуклеокапсида – является вирусной полимеразой, с ним также связывают мРНК 5'-кепирующую, 3'-поли(А)- и протеинкиназную активность. Белок G формирует поверхностные пепломеры вирусов (65–90 кДа) и обладает гемагглютинирующей активностью. Белок N является основным компонентом вирусного нуклеокапсида (47–62 кДа), связан с (-)РНК и (+)РНК полной длины и дефектными РНК, но не с мРНК. Вновь синтезированный N-белок модулирует транскрипцию и репликацию генома. Белок NS (или P, или M1 с м.м. 20–30 кДа) является компонентом вирусной полимеразы и участвует в транскрипции. Растворимая форма белка присутствует в цитоплазме инфицированных клеток, она может предотвращать агрегацию белка N и способствовать инкапсидации РНК в нуклеокапсид. Белок M (или M2) с м.м. 20–30 кДа иногда фосфорилирован, является основным компонентом вириона, обнаружен в ядре и ингибирует транскрипцию в клетке растения-хозяина.

*Липиды.* Вирионы содержат 15–25% липидов. Состав последних зависит от состава клеточных мембран растения-хозяина, от которых отпочковываются вирионы. Обычно в их составе содержится 35–40% стиролов и гликолипидов. Белок G ковалентно связывает жирную кислоту, проксимальную к липидной оболочке.

*Углеводы.* В состав рабдовирусов входит 3% углеводов (по массе). Они представлены цепями N-гликанов на G-белке и гликолипидами.

*Организация генома.* Вирусы кодируют не менее 5 ОРС в (-) смысловом геноме в следующем порядке: 3'-N-NS-M-G-L-5'. У некоторых вирусов могут быть и другие гены. Гены транскрибируются последовательно от 3'- к 5'-концу матрицы вирусной РНК, образуя 5'-кепированные, 3'-полиаденилированные и обычно моноцистронные мРНК. Для некоторых видов вирусов выявлены полицистронные мРНК. Кроме того, с

3'-конца вирусной РНК транскрибируется короткая некепированная, неполиаденилированная и нетранскрибируемая «лидерная» РНК, предшествующая мРНК N-белка. В отличие от мРНК она имеет на 5'-конце трифосфат. «Лидерная» РНК обнаруживается в ядре инфицированных клеток. мРНК вируса обычно имеют подобную 5'-концевую последовательность, как правило, m7Gppp(m)AmA(m)CA. После проникновения вируса в клетку вирусная оболочка отделяется под действием лизосомального фермента и в цитоплазме обнажается транскрипционно активный нуклеокапсид (РНК и белки N, L, NS). Происходит транскрипция вирусной РНК вирионной транскриптазой в мРНК, которые транслируются на цитоплазматических полисомах, кроме мРНК G-белка, которая транслируется на мембранносвязанных полисомах. Вслед за трансляцией происходит РНК-репликация (синтез полной длины (+) и затем (-) РНК) в цитоплазме (вирусы рода *Cytorhabdovirus*) либо в ядре (вирусы рода *Nucleorhabdovirus*) с участием вновь синтезированных белков N, NS (M1) и L. После репликации следуют дальнейшие циклы транскрипции (вторичная транскрипция), трансляции и репликации. Структуры вирусного нуклеокапсида затем собираются, соединяясь с белком М (M2) и липидными оболочками, содержащими вирусный белок G. Местом формирования частиц у циторабдовирусов растений являются интрацитоплазматические мембраны, ассоциированные с вироплазмой, а у нуклеорабдовирусов – внутренняя ядерная мембрана.

**Антигенные свойства.** Белок G участвует в иммунохимической реакции вирусной нейтрализации и определяет серотип вируса. Белок N является перекрестно реагирующим комплементфиксирующим (GF) антигеном. Между вирусами разных родов возможно антигенное родство капсидных белков.

**Биологические свойства.** Рабдовирусная инфекция поражает, как правило, все ткани растений и носит характер системной реакции. Рабдовирусы поражают широкий круг растений, однако каждый вирус имеет свой специфический круг растений-хозяев, которыми могут быть как однолетние, так и двулетние растения (Peters, 1981).

**Передача.** Большинство рабдовирусов растений переносятся цикадками, дельфацидами или тлями, некоторые – червцами, клещами или клопами-кружевницами, а также передаются механически соком больного растения. Вирусы, как правило, реплицируются в насекомых-переносчиках и в культуре их клеток. До настоящего времени нет ни одного сообщения о семенной передаче.

### Род *Cytorhabdovirus*

Типовой вид рода *Cytorhabdovirus* – вирус некротической желтухи салата-латука *Lettuce necrotic yellow virus*. Помимо него в список рода включены около десятка видов. На Дальнем Востоке России и в Сибири выявлены и изучены свойства двух рабдовирусов растений, которые относятся к роду *Cytorhabdovirus*. Это вирусы закукливания злаков *Oat pseudorosette virus* и северной мозаики злаков *Northern cereal mosaic virus*.



Циторабдовирусы реплицируются в цитоплазме инфицированных клеток в непосредственной связи с вироплазмой, образованной массами нитевидных структур.

### Вирус закукливания злаков *Oat pseudorosette virus*

Вирус закукливания злаков (ВЗЗ) *Oat pseudorosette virus* – первое вирусное заболевание зерновых культур, которое было обнаружено в России в 20-е годы в Омской области. Некоторые исследователи считали, что этот вирус идентичен вирусу северной мозаики злаков *Northern cereal mosaic virus* (Murayama, Lu, 1967; Slykhuis, 1976). До 40-х годов в отдельных районах Западной и Восточной Сибири, а также на Дальнем Востоке поражение зерновых этим вирусом носило эпифитотийный характер, в дальнейшем поражение зерновых болезнью «закукливание злаков» снизилось, и эпифитотий больше не наблюдали (Развязкина, 1975). Впервые вирусную природу заболевания предположил К.Е. Мурашкинский (1935). Вирус был зарегистрирован в Башкирии, Сибири и на севере Казахстана (Крылов и др., 1987). В других странах сведений об этом заболевании не имеется. В отдельных публикациях отечественных фитовирусологов в последнее время отмечалось, что ВЗЗ часто встречается на злаковых культурах в смешанной инфекции с микоплазмой (Келдыш, Помазков, 2003; Власов, Самсонова, 2005).

**Биологические свойства. Морфология вирионов.** В первые годы изучения ВЗЗ исследователи не могли понять природу заболевания и связывали ее с климатическими факторами или с повреждениями насекомыми. Впервые удалось увидеть возбудителя заболевания закукливания злаков В.Л. Федотиной (1974). С помощью электронного микроскопа на ультратонких срезах в цитоплазме больных растений овса были обнаружены бациллоподобные вирионы. Эти результаты вскоре подтвердила Н.И. Виноградова (1978), обнаружив вирус на сибирских сортах овса. В конце 80-х гг. в пораженных ВЗЗ растениях овса из Новосибирской области обнаружены характерные для этого вируса пулевидные и бациллоподобные зрелые частицы размером 165–170 × 63–68 нм в суспензии растительного сока и 180–200 × 66–70 нм в срезах (Штейн-Марголина, Мамаев, 1990) (рис. 10).

Идентификация патогена, вызывающего заболевание типа закукливания злаков, в те годы велась весьма интенсивно, и в первую очередь, как это было принято тогда, по внешним симптомам заболевания. Они проявлялись в чрезмерной кустистости, подавленности роста (а часто и карликовости), стерильности (в случае тяжелого поражения), пролиферации соцветий (израстании завязи). С.Д. Гребенников (1941) назвал этот тип заболевания псевдорозеточной (*pseudorosette*) болезнью, так как наблюдал при поражении овса образование карликовых розеток высотой 10–15 см, состоящих из 20–70 побегов. В это же время К.С. Сухов и А.М. Вовк (1938, 1940) сообщили о ранее не отмеченном симптоме, по мнению авторов, наиболее характерном для этого заболевания, который появлялся раньше других на больных растениях – зеленая мозаика на листьях. Рисунок мозаики состоял из светло-зеленых полос, пунктиров и удлиненных пятен, которые вытянуты вдоль жилок листа. Кроме того, эти авторы

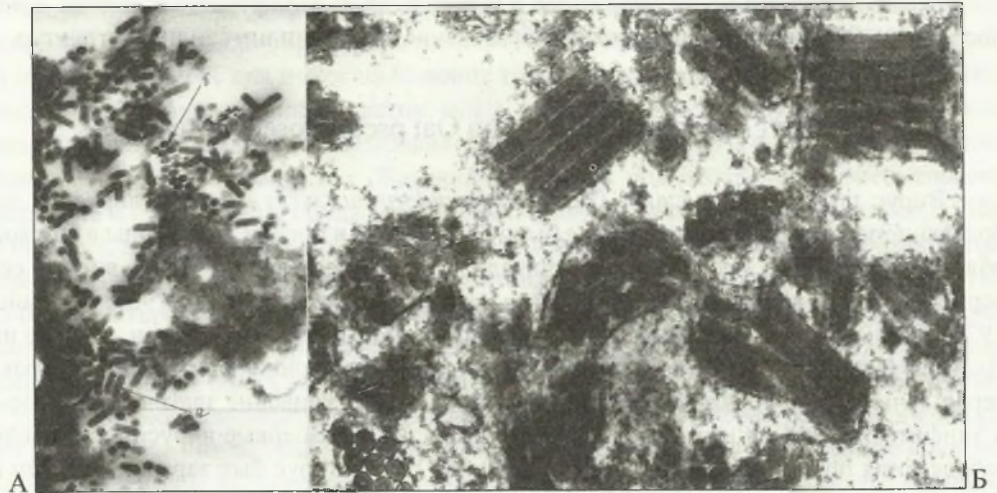


Рис. 10. Электронные микрофотографии вирионов ВЗЗ (фото В.А. Штейн-Марголиной и Ю.П. Мамаева, 1998). Срезы вирионов – продольный (А) и поперечный (Б) ( $\times 60000$ )

отметили специфические симптомы для этого заболевания – деформацию листьев и корневой системы.

П.Ю. Мамаев (1998) на восприимчивость к ВЗЗ экспериментально проверил 70 видов растений из 25 родов и показал, что 36 видов из 13 родов проявили характерные симптомы. Наиболее восприимчивой зерновой культурой к ВЗЗ, по его данным, являлся овес *Avenum sativum*, а также другие виды из рода *Avena*. ВЗЗ поражал пшеницу, ячмень, просо. У этих растений наблюдались мозаичность, розеточность, карликовость листьев, деформация корневой системы и стерильность, но в отличие от овса у этих культур никогда не проявлялись симптомы израстания завязи и образования вегетативных побегов из генеративных органов (колосков) (Сухов, Вовк, 1940). Из культурных злаков ВЗЗ не поражал рожь и кукурузу.

**Передача.** Вирус резервируется в многолетних сорняках и в цикадах-переносчиках, не передается механически и семенами. Был найден единственный переносчик вируса – темная цикадка *Laodelphax striatellus* Fall. Взаимоотношения переносчика и вируса изучали К.С. Сухов и М.Н. Сухова (1940). Передача вируса этой цикадкой происходит персистентно. Позже детально была изучена биология темной цикадки, а также непосредственно связанная с этим циркуляция вируса в природе, установлен инкубационный период ВЗЗ в переносчике, время приобретения инфекции и передачи, максимальный процент пораженности популяции переносчика, отсутствие трансвариабельной передачи (Мамаев, 1998).

**Вирусные включения.** Протекание инфекционного процесса, вызываемого рядом рабдовирусов растений, связано с формированием в клетках инфицированных растений белковых включений (Сухов, 1940; Виноградова, Распопова, 1969; Крылов



и др., 1981; Минская и др., 1987). Эти включения формируются из так называемого растворимого антигена, например, у вирусов мозаики озимой пшеницы и вируса закукливания злаков (Попова, Атабеков, 1966; Минская и др., 1987).

Вредоносность ВЗЗ на Дальнем Востоке и Сибири была в 20–40-е годы чрезвычайно высока. Маршрутные обследования сельскохозяйственных районов юга Дальнего Востока России, Камчатки, Сахалина, Западной и Восточной Сибири в 90-е годы позволили выявить географическое распространение ВЗЗ. В Омской и Новосибирской областях пораженность зерновых ВЗЗ была не более 1–3%. В Предбайкалье, Забайкалье и на Дальнем Востоке России ВЗЗ не выявлен (Мамаев, 1998).

Пока вирус не включен МКТВ ни в один из двух родов фиторабдовирусов, но судя по изученным критериям идентификации, изолят этого вируса, выявленный в Западной Сибири, безусловно является новым видом рода *Cytorhabdovirus* семейства *Rhabdoviridae*.

### Вирус северной мозаики злаков *Northern cereal mosaic virus*

Заболевание, вызываемое вирусом мозаики злаков (ВСМЗ), было обнаружено впервые в Японии на острове Хоккайдо в 1910 г. и получило название – мозаика пшеницы. В те времена эту болезнь связывали с поражением растений нематодами или закисленностью почв (Miyayama, Lu, 1967). В 1943 г. японские исследователи (Ито, Фукуси, 1944) в клетках больных растений овса обнаружили белковые включения и установили переносчика инфекции – темную цикадку *Laodelphax striatellus* Fall. Ими первыми было сделано предположение о вирусной природе заболевания. В Китае в начале 60-х годов подобное заболевание получило название розеточной карликовости пшеницы (Lin et al., 1983) и до сих пор употребляется как синоним ВСМЗ (Liang, 1998).

В Сибири и на Дальнем Востоке России сходства внешних признаков поражения вирусом злаковых культур и наличие общего переносчика на всей территории распространения заболевания (Омская, Амурская, Иркутская области) не вызывало сомнения в том, что заболевание индуцируется одним и тем же патогеном – вирусом закукливания злаков. Однако электронно-микроскопические исследования мозаичных растений овса на юге Амурской области показали (Крылов и др., 1981), что заболевание вызывается сходным по морфологии, но отличающимся по размерам вирионов возбудителем, который распространен только на Дальнем Востоке России – в Амурской области и Приморском крае.

**Свойства вирионов. Морфология.** Исследования, проведенные дальневосточными фитовирусологами показали, что новый для ДВ региона рабдовирус имел частицы двух форм – бациллоподобной и пулевидной с размерами  $420 + 50 - 67 + 8$  нм. Вирионы обнаружены были практически во всех типах клеток листьев и расположены внутри цистерн ретикулума, реже свободно лежали в цитоплазме. В ядрах, хлоропластах и митохондриях вирионов не обнаружили. Помимо зрелых вирионов в цитоплазме на-

блюдаются электронно-плотные гранулярные массы – вироплазмы и группы турбулярных образований, по размерам и строению соответствующих нуклеокапсиду. Эти структуры являлись стадиями формирования вирионов. Вирус получил первоначальное название – мозаики злаков *Cereal mosaic virus* (Бородина и др., 1982). Вирусные частицы в суспензии сока больных растений (негативное контрастирование), как правило, сильно разрушались. Многие имели пулевидную форму. Немногочисленные целые вирусные частицы были близки по размерам таковым на срезах и составляли  $380-450 \times 50-70$  нм. Изредка в суспензии встречались частицы  $600-800$  нм. В суспензии вирофорных цикад обнаружены пулевидные частицы (разрушенные), зрелые с оболочкой (Коцарь, Мамаев, 1996). И только позже, после тщательного изучения свойств этого вируса и сравнительной характеристики по морфологии, биологическим и антигенным свойствам с китайским изолятом ВСМЗ, имеющим распространение в провинции Хейлундзян, расположенной в северо-восточной части Китая и граничащей с ДВР (рис. 11), и с японским изолятом ВСМЗ, был сделан вывод, что российский изолят ВСМЗ очень близок по своим свойствам к вирусу, распространенному в странах АТР, и является дальневосточным российским штаммом ВСМЗ (Гнутова, 1993).

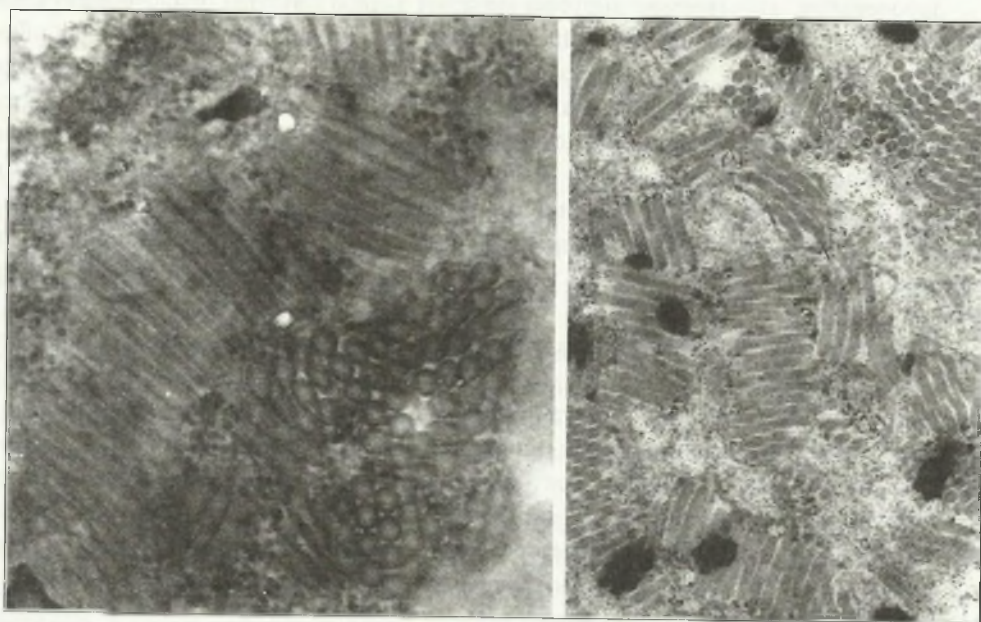


Рис. 11. Электронные микрофотографии вирионов китайского изолята ВСМЗ (фото Жан Минхоу – проф. Северо-Восточной сельскохозяйственной академии, г. Харбин, КНР)

**Биологические свойства.** Изучение круга растений-хозяев ВСМЗ показало, что из испытанных экспериментальным путем растений 90 видов из 47 родов только растения 22 родов оказались восприимчивыми к вирусу. Вирус поражал из зерновых



культур пшеницу, овес, ячмень, в меньшей степени просо и рожь. Экспериментально к вирусу восприимчивы были растения более 30 видов и сортов из различных родов: *Aegilops* (*A. triuncialis*; *A. ovata*), *Agropyron* (*A. trichophorum*), *Agrostis* (*A. gigantean*), *Alopecurus* (*A. myosuroides*), *Anisantha*, *Avena*, *Brachypodium*, *Briza* (*B. minor*), *Bromus* (*B. mollis*; *B. commutatus*; *B. japonicus*; *B. secalinus*; *B. sguarrosus*; *B. sterilis*; *B. tectorum*; *B. ramosus*), *Chloris* (*C. Virgata*), *Digitaria* (*D. sanguinalis*), *Hordeum* (*H. vulgare*; *H. nutans*; *H. murinum*), *Lolium* (*L. mutiflorum*; *L. temulentum*), *Panicum* (*P. capillare*; *P. miliaceum*), *Phalaris* (*P. canaviensis*; *P. minor*), *Phleum* (*P. alpinum*), *Secale* (*S. italica*; *S. viridis*; *S. verticillata*), *Setaria* (*S. cereale*), *Trisetum* (*T. flavescens*), *Triticum* (*T. aestivum*; *T. boeoticum*; *T. durum*; *T. molanopus*).

Среди сорных и дикорастущих злаков симптомы ВСМЗ обнаружены на овсягюе обыкновенном *Avena fatua* L., щетиннике зеленом *Setaria viridis green* L. и щетиннике Фабера *S. faberi* Herrm.

Внешние признаки заболевания проявлялись в виде четкой светло-зеленой штриховатости (мозаики) и полосчатости листьев, низкорослости и карликовости, розеточности; больные растения имели недоразвитую корневую систему. У пораженного овса иногда наблюдалась пролиферация соцветий (израстание завязи), часто не образовывалась метелка, а если метелка формировалась, то зерно в ней было шуплое или совсем не вызревало. Тяжесть проявления заболевания злаков зависела от того, на какой стадии развития они инфицировались вирусом. Растения, заразившиеся на ранних стадиях, не только превращались в культиющиеся карликов, но и нередко погибали. Наилучшим растением-индикатором был овес (сортовые различия не обнаружены), четкая штриховатая мозаика на нем появлялась на 5–10-й день после заражения. ВСМЗ не поражал рис и кукурузу. Этот вирус в отличие от ВЗЗ поражал значительно больше растений, в том числе и рожь, которую не поражает ВЗЗ. Яркая штриховая мозаика на больных растениях – наиболее характерный признак ВСМЗ. Некоторые виды растений из родов *Agrostis* (*A. stolonifera*), *Alopecurus* (*A. pratensis*), *Calamagrostis* (*C. langsdorfii*), *Eleusine* (*E. aegyptica*; *E. indica*), *Lolium* (*L. perrene*), *Setaria* поражались латентно (Мамаев, 1991).

**Передача.** Вирус не передавался семенами, через почву и механической инокуляцией инфекционного сока. При изучении мозаичного заболевания злаков на юге Амурской области Н.И. Немилостевой и Е.Е. Соколовой (1977) была установлена его передача темной цикадкой. Как оказалось, темная цикадка – единственный естественный переносчик ВЗЗ и ВСМЗ, других способов передачи не обнаружено. Биология переносчика детально изучена на юге Амурской области (Мамаев, 1998). По данным этого автора, цикадка способна длительное время сохранять в себе инфекционный вирус и быть резерваторм инфекции (ВЗЗ и ВСМЗ перезимовывают в цикадке). Развитие и размножение темной цикадки происходит преимущественно на посевах зерновых. Наибольшая численность переносчика наблюдается в зерносеющих районах. На Дальнем Востоке и в Сибири ВСМЗ обнаружен в Приморском и Хабаровском краях, Амурской и Читинской областях. Наибольшая вредоносность от вируса наблюдается на юге Амурской области, где заболевание, вызываемое вирусом, носит

характер эпифитотий. В конце мая–начале июня цикадки откладывают яйца в ткани листьев и стебли растений. Длительность стадии яйца 7–12 дней и зависит от окружающей температуры. Экспериментально доказано, что ВСМЗ не передается трансвариально (от самки потомству), поэтому отродившиеся личинки свободны от вируса. Заражение цикадок происходит при их питании на больных растениях. Установлено, что питание здоровых личинок на мозаичных растениях в течение 6 ч обеспечивало заражение насекомых на 3,9%. После приобретения инфекции цикадки способны заражать растения только на 10–16 день (инкубационный период вируса в переносчике). Вирофорные цикадки без дополнительного источника инфекции могут заражать растения почти до конца своей жизни (максимально зарегистрировано – до 68 дней). В эксперименте одной цикадкой за 10 ч удалось заразить 15 растений. Минимальное время для заражения здорового растения вирофорной цикадкой 5 мин. В слюнных железах цикадок с помощью электронного микроскопа были выявлены пулевидные частицы размером 215–250 × 62–65 нм. Итак, особенности взаимоотношений ВСМЗ с переносчиком указывают на то, что вирус размножается не только в растении, но и в насекомом (Мамаев, 1989).

**Физико-химические свойства.** При изучении состава вирусных частиц ВСМЗ были обнаружены фосфолипиды и стиролы. РНК имеет м.м. 3,5 мДа. По данным японских исследователей (Shirako, Ehara, 1985), вирусные частицы содержат белки с м.м. 63 (G), 47 (N), 17 (M) кДа и один минорный белок – 88 кДа. Выделены 5 структурных белков с м.м. 70 (G), 58 (N), 55 (NS) 45 (M<sub>1</sub>), и 36 (M<sub>2</sub>) кДа (Минская и др., 1987).

Были получены очищенные препараты антигенов ВЗЗ (Сухов и др., 1943) и вируса мозаики озимой пшеницы (Попова, 1968), а также растворимых антигенов ВЗЗ и ВСМЗ (Минская и др., 1985). Установлено, что м.м. белков (растворимых антигенов) у этих вирусов составляла 36 кДа. Для получения очищенных препаратов растворимого антигена ВСМЗ применялся метод изоэлектрической преципитации (Попова, Атабеков, 1966; Atabekov et al., 1968) и модифицированная методика (Сапоцкий и др., 1992). Листья растений (50 г), инфицированных ВСМЗ, гомогенизировали в 0,1 М трис-НСl буфере, рН 8,0 (3 мл/1г листьев). Экстракт отжимали через ткань и центрифугировали 30000 г в течение 1ч. Осадки отбрасывали. Супернатант подкисляли 0,1 М НСl до рН 6,0, центрифугировали 5000 г, осадки отбрасывали, вируссодержащую жидкость вновь подкисляли до рН 4,8–5,0, инкубировали от 1 до 18 ч, а затем центрифугировали 5000 г 15–20 мин. Осадки суспендировали в половинном (от исходного) объеме 0,1 М трис-НСl буфере, рН 8,0, центрифугировали 5000 г 15–20 мин, осадки отбрасывали. Супернатант вновь подкисляли до рН 4,8–5,0. Процедура переосаждения осуществлялась четырежды. Финальной стадией очистки вируса была денатурация балластных веществ замораживанием препарата при –15 °С, оттаиванием и низкоскоростным центрифугированием.

В растениях, инфицированных ВСМЗ, присутствует растворимый вирусспецифический белок (15–16 кДа), который не встречается ни в здоровых, ни ВЗЗ-инфицированных растениях овса (рис. 12). В процессе очистки растворимого антиге-



на при подкислении до pH 5,0–4,8 экстракт становился мутным и обладал двойным лучепреломлением в световом потоке. При просматривании такого препарата в оптическом микроскопе в нем наблюдали белковые кристаллы игловидной формы. К этому антигену была приготовлена специфическая антисыворотка, которая не реагировала с белками здоровых и инфицированных ВЗЗ растений, а реагировала только с соком растений, зараженных ВСМЗ, и очищенными препаратами растворимого белка этого вируса.

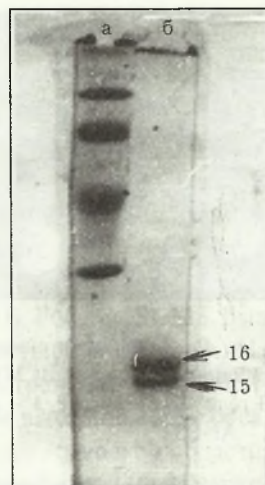
Вирусспецифический растворимый белок антигена ВСМЗ м.м. 15 и 16 кДа существенно отличается от белка с м.м. 36 кДа, выделенного ранее (Минская и др., 1985; Сапоцкий и др., 1991).

**Антигенные свойства.** Интерес к изучению вирусов, поражающих злаки, вызван их вредоносностью в период эпифитотий. Визуальная диагностика затруднена из-за сходства симптомов. В связи с этим возрастает роль методов иммунодиагностики при идентификации и изучении вирусов злаков (Adam et al., 1987). В задачу наших исследований входило изучение антигенных и иммуногенных свойств ВСМЗ и ВЗЗ, поиск путей повышения их иммуногенности с целью получения активных специфических антивирусных сывороток и определение антигенного родства между изучаемыми фиторабдовирусами. Слабая иммуногенная активность и чрезвычайная лабильность циторабдовирусов осложняли получение активных специфических антисывороток к изучаемым вирусам (Гнутова, 1993; Herold, 1972; Jackson, Chrisite, 1977). Из-за нестабильности вирионов мы были вынуждены иногда ограничиваться введением животным лишь частично очищенных препаратов. Кроме того, учитывался и тот факт, что для ВСМЗ и ВЗЗ была характерна низкая концентрация в соке больного растения.

Иммуногенами иммунизировали животных внутримышечно и комбинированным способом – внутримышечно и внутривенно. Общая доза вируса колебалась в пределах от 2 до 4,5 мг. Схемы иммунизации включали от 2–8 до 3–4 инъекций с недельным интервалом. Для стимуляции иммунного ответа использовали несколько адъювантов: альгинат натрия (Sodium alginate), адъювант Фрейнда (adjuvant Freund), чешский 2-компонентный масляный адъювант «Al-Spain-Oil».

Для постановки РДД брали два вида агара – 0,8–1,0%-ные «Vacto-agar» (Ferrak, FRG) и «Difco» (США). Агар растворяли в буфере, используемом для выделения вируса, или в 0,85%-ном растворе хлористого натрия. Для более четкого проявления линий преципитации в агар добавляли 1,5%-ный ПЭГ, а перед постановкой РДД для

**Рис. 12.** Электрофорез препарата растворимого антигена ВСМЗ (фото В.М. Сапоцкого): а – растворимый белок ВСМЗ, б – белки-маркеры (снизу вверх): карбокси-пептидаза, яичный альбумин, бычий сывороточный альбумин, фосфоорилаза. Стрелками указано положение зон полипептидов м.м. 15 и 16 кДа в 18%-ном ПААГ



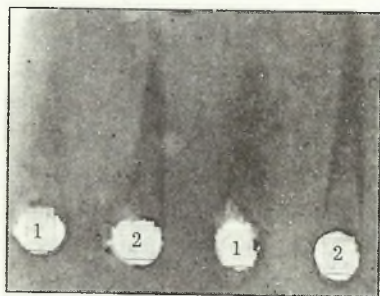


Рис. 13. Антигенное родство капсидных белков ВСМЗ и ВЗЗ. В геле – Ас к ВСМЗ, 1 – Аг-ВСМЗ, 2 – Аг-ВЗЗ

на ранней стадии инфицирования зерновых культур, но и использовать ИФА при детекции вируса при хронической инфекции в многолетних растениях-резерваторах вируса. Кроме того, непрямой вариант ИФА получены были данные о присутствии ВСМЗ в гомогенатах из вирофорных цикад.

Ракетным иммуноэлектрофорезом (РИЭФ) выявлено наличие как общих (родоспецифических) эпитопов капсидных белков, так индивидуальных (видоспецифических) у исследуемых нами циторабдовирусов (рис. 13).

Экспериментально подбирали разведение антисыворотки, которое соответствовало 1:10–1:15. В лунки вносили по 5 мкл антигенов или только что выжатый неразведенный сок зараженных растений. Антигены перед постановкой РИЭФ разрушали ультразвуком. Преципитационные пики формировались с антисывороткой (разведение 1:25) к японскому изоляту ВСМЗ (антисыворотка получена от доктора Ю. Ширако). Реакция шла 2 ч при 37 мА, 70 В или же 1 ч при 45 мА, 90 В.

Результаты непрямого варианта ИФА позволили выявить антигенное родство между российским и китайским изолятами ВСМЗ. Для изучения антигенных взаимоотношений между изолятами вируса использовали Ас, приготовленную нами к растворимому и нерастворимому антигенам ВСМЗ (иммуногены были получены М.В. Сапоцким), и китайскую Ас, переданную проф. Джан Минхоу (Северо-Восточная сельскохозяйственная академия, г. Харбин, КНР). Антигенами служил сок из растений овса и пшеницы, зараженных ВСМЗ (китайский полевой материал). Все три антисыворотки положительно реагировали с китайскими образцами растений и не реагировали с соком здоровых растений (контроль). Наиболее четко специфическую реакцию наблюдали между китайскими изолятами вируса с китайской специфической антисывороткой, слабее – с российскими антисыворотками. Полученные данные свидетельствовали о наличии идентичных эпитопов у китайского и российского изолятов ВСМЗ.

Таким образом, доказано антигенное родство изолятов ВСМЗ из России, Китая и Японии. Работы японских, китайских и российских вирусологов показали их сходство



по морфологии вирусных частиц, кругу поражаемых ими растений, взаимоотношению с переносчиком – темной цикадкой. Не вызывает сомнений, что российский изолят вируса является одним из известных в литературе – циторабдовирусом северной мозаики злаков, а не вирусом мозаики злаков, как его первоначально назвали российские исследователи (Крылов, 1992). Кроме того, показано по литературным данным, что российский изолят ВСМЗ по перечисленным выше свойствам имеет сходство и с другими видами циторабдовирусов: большое с вирусом розеточной карликовости пшеницы *Wheat rosette dwarf virus*, в меньшей степени – с вирусом желтой штриховатой мозаики ячменя *Barley yellow streak mosaic virus*.

В результате маршрутных обследований агроценозов ДВ России ВСМЗ был выявлен в Приморском, Хабаровском краях, в Амурской и Читинской областях. На Сахалине, Камчатке и в Сибири ВСМЗ не обнаружен. Распространение ВСМЗ приурочено к бассейну реки Амур и связано с производственным выращиванием овса, пшеницы и ячменя. Наиболее часто этот вирус встречался на юге Амурской области, где пораженность посевов овса, пшеницы и ячменя носила эпифитотийный характер и вызывала значительные потери урожая. Это объясняется тем, что циркуляция ВСМЗ в естественных условиях непосредственно связана с биологией переносчика, а поражаемость посевов зерновых – с его численностью и вирофорностью цикадок. ВСМЗ и ВЗЗ частично сохраняют связь с природными очагами инфекции (вирусы могут сохраняться в многолетних злаках). Однако в условиях агроценозов резервация вирусов в многолетниках не играет существенной роли. Главным источником инфекции является переносчик, в котором вирусы сохраняются в зимнее время. В районах, где под зерновые отведены небольшие площади и где существует естественная изоляция посевов друг от друга, резервация инфекции в многолетниках имеет большое значение для сохранения вирусов.

Итак, изучены два циторабдовируса и показано, что ареал их распространения не совпадает. ВЗЗ встречается только в сибирских регионах России, а ВСМЗ – на ДВ России, и главным образом в основной зерносеющей житнице региона – Амурской области.

---

## Семейство Luteoviridae

---

Вновь образованное в 2005 г. семейство *Luteoviridae* после разделения рода лютеовирусов и введения в семейство нового рода энамовирусов представлено тремя родами: лютеовирусы *Luteovirus* с типовым представителем – вирус желтой карликовости ячменя *Barley yellow dwarf virus*, полеровирусы *Polerovirus* – вирус скручивания листьев картофеля *Potato leafroll virus* и энамовирусы *Enamovirus* – вирус деформирующей мозаики гороха 1 *Pea enation mosaic virus 1*.

### Таксономическая структура семейства

Роды: *Luteovirus*  
*Polerovirus*  
*Enamovirus*

Происхождение названий: luteo от латинского названия *luteus* – желтый, polero – от *Potato leafroll virus*, enamo – от *Pea enation mosaic virus 1*.

Вирионы видов этого семейства гексагональные, диаметром 25–30 нм с икосаэдрической симметрией ( $T = 3$ ).

**Физико-химические и физические свойства вирионов.** Представители разных родов имеют м.м. вирионов – от 4,4 до  $6,5 \times 10^6$ ,  $S_{20,w}$  – от 91 до 127 S, плавучая плотность в CsCl – 1,40–1,42 г/см<sup>3</sup>

**Нуклеиновая кислота.** Вирионы содержат одну молекулу линейной (+)онРНК длиной 5600–5882 нт у вирусов разных родов. РНК вирусов некоторых родов имеет 5'-концевой VPg (связанный с геномом вирусный белок), 3'-конец не имеет поли(А).

**Белки.** Обычно один структурный белок м.м. 22 кДа.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

**Организация генома и репликация.** Геномы содержат 5–6 ОРС, которые кодируют специфические белки от 4 до 84 кДа; некоторые из них транслируются с субгеномной мРНК. Роды семейства также отличаются по структуре 5'-конца и расположению ОРС.

**Антигенные свойства.** Вирусы – активные антигены от умеренной до сильной степени (лютео- и полеровирусы).

**Биологические свойства.** Большинство лютео- и полеровирусов имеют круг хозяев, ограниченный одним семейством злаковых *Gramineae*. Они передаются тлями специфично циркулятивным способом: из флоэмы проникают в гемоцель и через гемолимфу попадают в слюнные железы. В растениях локализуются во флоэме, вызывают некротизацию тканей, замедление роста, потерю хлорофилла и пожелтение листьев. Биологические свойства энамовируса деформирующей мозаики гороха 1 определяют его специфическим взаимодействием с умбравирусом *Pea enation mosaic virus 2*.

В ДФО выявлены вирусы всех трех родов семейства *Luteoviridae*.



Род *Luteovirus*

Вирус желтой карликовости ячменя-*PAV* (ВЖКЯ-*PAV*) *Barley yellow dwarf virus-PAV* – типовой вид рода. Помимо него род включает еще два представителя: вирус желтой карликовости ячменя-*MAV* (ВЖКЯ-*MAV*) *Barley yellow dwarf virus-MAV* и вирус желтой карликовости ячменя-*SGV* (ВЖКЯ-*SGV*) *Barley yellow dwarf virus-SGV*.

Вирионы вирусов рода *Luteovirus* изометрической формы, 20–30 нм в диаметре.

М.м. вирионов –  $6,5 \times 10^6$ , плавучая плотность в CsCl – 1,40 г/см<sup>3</sup>,  $S_{20,W}$  104–27 S; они устойчивы к замораживанию, хлороформу и неионным детергентам.

Геномная РНК на 5'-конце не имеет VPg, ген 0 (ОРС 0), отмечено лишь малое перекрытие между генами 1 и 2. Она содержит 6 ОРС, из них ОРС 1 кодирует белок 39 кДа с геликазными мотивами, ОРС 2 – белок 60–61 кДа (предположительная РНК-зависимая РНК полимераз), ОРС 3 – белок оболочки 22 кДа, ОРС 4 – транспортный белок или VPg 17 кДа, ОРС 5 – белок 43–52 кДа как возможный фактор передачи вирусов тлями и ОРС 6 – белок 4–7 кДа с неизвестными функциями. ОРС 4 находится полностью внутри ОРС 3; эти ОРС, как и ОРС 5 и ОРС 6, транслируются с субгеномным РНК, причем ОРС 5 транслируется при прочтении вслед за трансляцией ОРС 3, а ОРС 6 – с отдельной субгеномной мРНК (цит. по: В.Г. Краев, 2001).

## Вирус желтой карликовости ячменя

*Barley yellow dwarf virus*

Вирус имеет сферическую форму, частицы размером 22–24 нм. Вирусная природа ВЖКЯ была впервые установлена в США в начале 50-х годов прошлого столетия (цит. по: К.А. Можаяева, Т.Б. Кастальева, 2002). Возбудителем заболевания первоначально считался один вирус, названный вирусом желтой карликовости ячменя, который по характерным свойствам был отнесен к группе лютеовирусов (Hunst, Tolin, 1985). Однако позже выяснилось, что заболевание, называемое желтой карликовостью ячменя, вызывается двумя вирусами ВЖКЯ и вирусом желтой карликовости злаков ВЖКЗ (*Cereal yellow dwarf virus, CYDV*). Последний представлен штаммом RPV. Причем известно, что эти вирусы передаются только тлями. Изоляты ВЖКЯ специфичны по отношению к своему единственному переносчику – тле. В зависимости от способности переноситься определенными видами тлей стали различать пять штаммов, передающих вирус персистентно. В настоящее время известно 98 видов тлей, которые могут служить потенциальными переносчиками вируса (Келдыш, Помазков, 2003), но только 23 вида из них считаются наиболее эффективными (Можаяева и др., 2007). Штаммы ВЖКЯ были объединены в две подгруппы и пять типов, причем типы не проявляли между собой антигенного родства капсидных белков. В I подгруппу вошли 3 типа: ВЖКЯ-*PAV*, переносчики вируса – *Rhopalosiphum padi* L. и *Macrosiphum avenae*; ВЖКЯ-*MAV* с основным переносчиком *M. avenae* и ВЖКЯ-*SGV* – *Schizaphis*

*graminum* Rondani. II подгруппа была представлена 2 типами: ВЖКЯ-*RMV*, переносимый *R. maidis* Fitch и ВЖКЗ-*RPV* – *R. padi*. К 2000 году МКТВ, анализируя данные по строению генома типов ВЖКЯ и ВЖКЗ и результаты других критериев идентификации, счел целесообразным отнести типы II подгруппы к самостоятельным вирусам и включить их в состав двух родов – *Luteovirus* и *Palerovirus*, сохранив за четырьмя типами – *PAV*, *MAV*, *SGV* и *RMV* – название ВЖКЯ, то есть к одинаковому названию каждого типа добавив лишь аббревиатуру штамма. Итак, заболевание, называемое желтой карликовостью ячменя, вызывается двумя вирусами ВЖКЯ и ВЖКЗ, отнесенными к родам *Luteovirus* и *Palerovirus*. В последние годы выделен штамм недавно идентифицированного ВЖКЯ-*RGV*, а в Китае ВЖКЯ-*GAV*. Всего же в литературе описан 41 фенотип ВЖКЯ (Келдыш, Помазков, 2003), имеющий сходство по антигенным и векторным свойствам.

**Биологические свойства.** ВЖКЯ – один из наиболее распространенных и вредоносных вирусов на зерновых культурах. Он поражает около 100 видов зерновых – пшеницу, ячмень, овес, кукурузу, рис и др., но особенно большой ущерб вирус наносит во время эпифитотий.

На растениях ячменя при заражении ВЖКЯ сначала появляется хлоротичность листьев. Затем они приобретают яркий золотисто-желтый цвет, переходящий затем в оранжевый (рис. 14 Б). При поражении молодых растений наблюдается интенсивное кущение и карликовость. Симптомы болезни на верхушках листьев обычно появляются на 14 день после инокуляции, а затем в виде неправильных пятен и полос распространяются вниз по пластинке листа (ячмень, овес), зачастую меняя его цвет на ярко-желтый или светло-желтый, иногда появляется ярко-красная пигментация (рис. 14 А). На листьях пшеницы наблюдаются различные оттенки желтой, красной или пурпурной окраски. Кроме того, вирус может вызывать повышенную жесткость



Рис. 14. Симптомы ВЖКЯ на овсе (А) и ячмене (Б) (фото К.А. Можасвой)



листьев, гибель цветков (овес, пшеница, ячмень). ВЖКЯ отличается высокой вредоносностью. Интенсивное проявление симптомов происходит в условиях достаточного количества теплых солнечных дней и слабее – при дождливой пасмурной погоде (Можаева, 2003).

ТТИ составляет 65–70 °С, вирус выдерживает замораживание и оттаивание в соке, устойчив к органическим растворителям – бутанол, хлороформ (Билай и др., 1988).

В растениях вирус локализуется во флоэме.

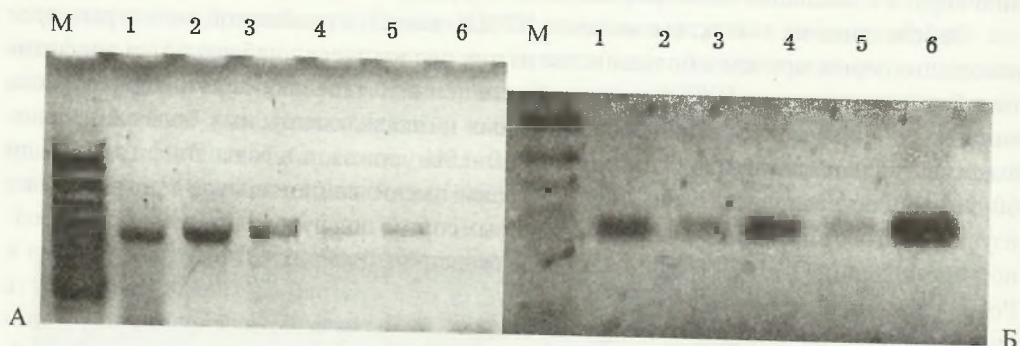
Основные переносчики ВЖКЯ в природе – тли (о чем мы уже упоминали выше), вирус относится к числу персистентных (циркулирующих в переносчике). Вирофорные (вирусифицированные) тли переносят вирус ветром на большие расстояния (Власов, Самсонова, 2005).

ВЖКЯ обладает довольно выраженными антигенными свойствами. Всестороннее изучение вируса стало возможным только в последние два десятилетия благодаря применению современных молекулярно-биологических методов для изучения структуры его генома, а также высоко чувствительных методов диагностики – ИФА с использованием поли- и моноклональных антител и ПЦР. При идентификации они дополняют результаты исследований по визуальной диагностике (симптоматологии) и выявлению вируса с помощью специфических тлей-переносчиков.

Заболевание на злаках, вызываемое ВЖКЯ, является проблемой всех стран, производящих зерно, причем в большинстве из них периодически наблюдаются эпифитотии. В настоящее время ВЖКЯ выявлен более чем в 50 странах. Желтая карликовость ячменя – одна из наиболее распространенных и опасных вирусных болезней зерновых культур, которая приводит к потерям 10–15% урожая, а в годы эпифитотий – до 60–90% (Lister, Ranieri, 1995). Многие страны имеют национальные программы по изучению этого вируса и созданию устойчивых сортов под руководством международной организации CIMMYT и ICARDA. К сожалению, бывший СССР не участвовал и Россия в настоящее время также не участвует в этой программе. Неосведомленность специалистов в вопросах, связанных с ВЖКЯ, не позволила им своевременно установить причины возникновения эпифитотии на серых хлебах в 1988–1991 гг. в европейской части России, когда было поражено более двух миллионов гектаров посевов овса и ячменя. Снижение урожая достигало 90% (Можаева, 2003).

В России ВЖКЯ впервые был выявлен в начале 60-х годов в Краснодарском крае во время эпифитотийного поражения зерновых культур, а затем в Московской области (Развязкина, 1975). Однако в течение последующих двадцати лет данных об этом заболевании в нашей стране не поступало. В бывшем СССР желтая карликовость была зарегистрирована в Прибалтике, Молдавии, Украине, но работы по изучению вируса и по селекции зерновых культур на устойчивость к этому вирусу не велись, за исключением Украины, где на естественном инфекционном фоне проводилась оценка имеющихся сортов на устойчивость к этому вирусу (Николенко, Омельченко, 1985). И только после эпифитотии в 1988–1991 гг. в европейской части России с 1991 по 2001 гг. изучением ВЖКЯ стали заниматься вирусологи из ВНИИФ. Они исследо-

вали штаммовый состав вируса и показали, что на всей европейской территории России встречаются штаммы ВЖКЯ – *PAV*, *MAV*, *SGV*, *RMV* и *ВЖКЗ-RPV* (Можаева и др., 2007 а). Наличие вирусной инфекции было ими подтверждено методами ИФА и ПЦР. Считалось, что вирус выделяется из растений с трудом. Ими была отработана оптимальная схема получения очищенного вирусного препарата из естественно инфицированных растений (полевой материал). Концентрация вируса в препарате была 100–500 мкг вируса на кг сырого растительного материала, что сравнимо с выходом ВЖКЯ из искусственно зараженных растений. Выход вируса из растений овса был несколько выше, чем из ячменя, но из ячменя получали препараты более чистыми. Листья со стеблями давали более низкий выход вируса, чем когда использовали только листья. Препарат вируса мог храниться несколько лет при –20 °С, а вирус в листьях, высушенных на воздухе при комнатной температуре, сохранялся в течение года при комнатной температуре. В поле предварительная идентификация вируса осуществлялась визуально, а в лабораторных условиях – передачей *PAV*-штамма ВЖКЯ тлей *Rhopalosiphum padi*, иммунодиагностику проводили ИФА при использовании МАТ к *PAV*-штамму ВЖКЯ и ОТ-ПЦР. Ниже приводим электрофореграммы (Можаева и др., 2007), полученные при выявлении ВЖКЯ ПЦР как в экспериментально зараженном, так и в полевом материале (рис. 15).



**Рис. 15.** Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с кДНК вирусных препаратов Ro-02 и Ro-03 (А) и растительных образцов овса и ячменя (Б). А: М – молекулярный маркер; препараты в разведении 0,2 и 4 – Ro-02 (1–3) и Ro-03 (4–6). Б: 1–3 – образцы ячменя, искусственно зараженные ВЖКЯ-PAV и взятые для анализа через 12, 5 и 7 дней; образцы с симптомами ВЖКЯ (полевой материал): 4 – овес и 5 – ячмень

Украинскими исследователями к вирусу была получена поликлональная антисыворотка (Евдокимова, Сидоров, 1995), а к двум наиболее распространенным в России штаммам – ВЖКЯ-*PAV* и ВЖКЯ-*RPV* получены МАТ (Ерохина, 1995). Оптимизирована схема проведения ИФА как с МАТ, так и ПАТ (коммерческие иммунодиагностикумы фирмы Agdia к штаммам *MAV*, *SGV*, *PMV*). Вирус выявляли как из сухого материала, так и хранившегося при –20 °С. Антигенные свойства вируса при этих способах хранения не утрачивались. С использованием иммунодиагностикумов



впервые был определен штаммовый состав ВЖКЯ в восьми регионах европейской части РФ. Оказалось, что среди штаммов ВЖКЯ наиболее распространенными являются ВЖКЯ-PAV и ВЖКЯ-RPV, что связано с относительно благоприятными условиями для жизнедеятельности тлей – переносчиков этих штаммов *M. avenae* и *Sch. graminum*. В Поволжье и Закавказье наряду с перечисленными штаммами встречали ВЖКЯ-PMV (Можаева, 2003).

Для ВЖКЯ, обнаруженном в Московской области, изучены источники инфекции и характер накопления вируса в период вегетации, резерваторы и очаги сохранения инфекции в осенне-зимний период (Можаева, Кастальева, 2002). По данным этих исследователей, серые хлеба, как правило, поражались не одним, а несколькими типами вируса. Их количество зависело от состава, численности и вирофорности тлей-переносчиков (Plumb, 1995), что определялось погодными условиями, влияющими как на выживаемость тлей в зимний период, так и на сохранение очагов вирусной инфекции, а также на возможности накопления и распространения первичной и вторичной инфекции и т.д. В последние годы изучены аспекты эпидемиологии ВЖКЯ на примере Московской области (Можаева, Кастальева, 2001). Искусственное заражение зерновых культур штаммом ВЖКЯ-PAV исследователи проводили с помощью тлей *Rhopalosiphum padi*. Оказалось, что уровень первичной инфекции на яровых злаках зависит от сохранения состава тлей в осенне-зимний период. Весной источником инфекции служат многолетние злаковые травы и сорняки, озимые и их падалица. Летом до всходов озимых основным источником являются смешанные посевы серых хлебов с бобовыми культурами и в меньшей степени злаковые травы и сорняки. В конце вегетационного сезона наряду с озимыми источником инфекции становятся падалица и подрост яровых культур на полях, где не производится зяблевая вспашка. Таким образом, авторы делают вывод, что всегда имеются и сохраняются стабильные очаги инфекции и векторы вируса.

До 90-х годов ничего не было известно о заболевании желтой карликовости в азиатской части России. Между тем на азиатском континенте ВЖКЯ довольно широко был распространен в странах Центральной Азии – Иране, Сирии, Турции, а также в Израиле и Иордании, где значительные площади заняты зерновыми культурами. В Китае, Индии, Пакистане и Японии заболевание желтой карликовости на злаках известно с начала 60-х годов, в Таиланде – с начала 80-х (Lister, Ranieri, 1995). Обнаружение вируса в сопредельных с Россией азиатских странах (за исключением Монголии) указывало на то, что в российскую азиатскую часть вирус оттуда может легко перенестись тлями с потоками воздуха. В 1995–2000 гг. ВЖКЯ действительно впервые был обнаружен на Урале, в Западной и Восточной Сибири и на Дальнем Востоке (Можаева и др., 2007 а). В этих регионах авторами выявлены все известные штаммы ВЖКЯ (PAV, MAV, SGV и RMV) и RPV-штамм ВЖКЗ. На территории ДФО ВЖКЯ этими исследователями идентифицирован в Приморском крае (Уссурийский, Артемовский, Ханкайский, Чугуевский, Партизанский, Спасский и Анучинский районы); в Хабаровском крае (Вяземский район); в Амурской области (Тамбовский, Благовещенский, Ивановский, Архаринский районы); в Сахалинской области (Анивский,

Томаринский району). На юге ДФО ВЖКЯ описан главным образом по некоторым фенотипическим свойствам на отдельных злаках (Дьяконов, Сапоцкий, 2001). Актуальность изучения дальневосточных изолятов ВЖКЯ очевидна, так как в случае благоприятных условий для размножения тлей существует реальная угроза эпифитотийных вспышек, что пагубно повлияет на эпидемиологическую ситуацию в ДФО.

### Род *Polerovirus*

Этот род выделен из рода *Luteovirus* на основании различий в структуре генома. Род довольно многочислен и состоит из 30 основных и предполагаемых видов. Причем, предполагаемых видов гораздо больше, чем четко идентифицированных по молекулярным критериям вирусов, поэтому точное положение предполагаемых видов в данном роде будет определено по мере изучения их структуры генома.

Геномная РНК вирусов этого рода содержит 5'-концевой VPG и ОРС, кодирующую белок 28–29 кДа с неясными функциями. ОРС 0 сильно перекрывается с ОРС 1, которая также сильно перекрывается с ОРС 2, ОРС 3, ОРС 4 и ОРС 5, все они экспрессируются с субгеномной РНК подобно лютеовирусам.

### Вирус скручивания листьев картофеля *Potato leafroll virus*

Вирионы вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК) изометрической формы, диаметром 24–29 нм. Характерной особенностью вируса является локализация во флоэме растений. Поражение флоэмы приводит к нарушению транспорта продуктов фотосинтеза из листьев в другие органы. Избыточное количество углеводов является характерной особенностью этой болезни, а скручивание листьев является его прямым следствием, поскольку обуславливает растяжение клеток губчатой паренхимы (Анисимов, 2004). В результате происходят нарушения в процессе клубнеобразования. При этом снижение продуктивности растений картофеля может достигать 70% за счет уменьшения массы клубней и их количества (Кваснюк и др., 2006). В растениях ВСЛК инактивируется при довольно низкой температуре –37,5 °С.

**Биологические свойства.** Круг растений-хозяев – *Solanum* sp., *Lycopersicon* sp. Лучшие тест-растения для этого вируса – *Physalis floridana* Rydb. (через 2–3 нед проявляется скручивание долей листьев, хлороз, отставание в росте) и *D. stramonium* (ярко выраженный межжилковый хлороз листьев). В полевых условиях на картофеле различают первичное и вторичное заражение картофеля этим вирусом. Первичное заражение картофеля, посаженного здоровыми клубнями, в течение вегетационного периода осуществляется вирофорными тлями. Симптомы – скручивание листьев, частичное изменение их цвета на желтый или розовый в зависимости от сорта – сначала наблюдаются на молодых верхних листьях, а затем на листьях более низких ярусов. При позднем инфицировании возможно, что симптомы не проявятся в год заражения вирусом. Вторично зараженными считаются растения, выросшие из инфицированных



ВСЛК семенных клубней. Клубни больных растений картофеля мелкие, гладкие, могут иметь внутренние некрозы. В этом случае видимые симптомы появляются через 1–1,5 мес. после появления всходов. Нижние листья складываются вдоль центральной жилки, приобретая кожистость и хрупкость, сильно шуршат, нижняя их часть может стать почти серебристой. Избыточное количество крахмала в листьях является постоянным симптомом болезни скручивания листьев картофеля, вызываемое вирусом, так как происходит растяжение клеток паренхимы. Постепенно с ростом растения эта кожистость распространяется вверх. Происходит изменение окраски листьев в сторону пожелтения – хлороза, нередко растения отстают в росте, края листьев часто приобретают антоциановую (красно- или розово-фиолетовую) окраску, что связано с накоплением в тканях повышенной концентрации сахаров (Богоутдинов, 2000). Внешние признаки лучше проявляются в сухую и жаркую погоду. Обычно такие растения отстают в росте, листья рано отмирают. Клубни некоторых сортов картофеля имеют внутренний некроз и веретеновидные ростки при прорастании (Кваснюк и др., 2006).

Вирус снижает урожай картофеля на 20–70% (Анисимов, 2004).

На юге ДФО в год заражения в естественных условиях у некоторых сортов картофеля симптомов проявления вирусной инфекции не наблюдается, так как концентрация вируса еще очень мала из-за позднего массового лёта тлей.

**Передача.** Механическая передача ВСЛК отсутствует, так как вирус не способен длительное время находиться вне клетки растения без потери инфекционности, но может передаваться прививкой или сорным растением повилика. Возможно искусственное заражение вирусом с помощью стеблевых прививок. Наибольшее распространение вируса происходит в те годы, когда отмечено большое количество крылатой тли. Известны разные виды тлей, основным переносчиком ВСЛК (по персистентному типу) является персиковая тля. После приобретения инфекции тля остается вирофорной в течение всей своей жизни. На юге ДВ в Приморском крае показана возможность передачи вируса 28-пятнистой картофельной коровкой *Epilachna 28-maculata* Motsch. и полевым клопом *Lygus pratensis* L. (Лебедева, 1969; Лебедева, Пинскер, 1969). Вирус сохраняется в клубнях картофеля, которые служат источником его распространения в следующем году. Имеются отдельные сведения о передаче вируса семенами картофеля (Власов, Самсонова, 2005).

ТТИ – 70–80 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ , ПСИ – 3–5 дней при 20 °С (Блоцкая, 2000).

**Антигенные свойства.** Долгие годы из-за трудностей при получении очищенного вирусного препарата не были разработаны методы его иммунодиагностики. В настоящее время к вирусу получены поликлональные антисыворотки и МАТ, на основе которых приготовлены коммерческие иммунодиагностикумы.

На ДВР типовой вид рода полеровирусов – вирус скручивания листьев картофеля идентифицирован в начале 60-х годов (Костин, 1966), и с тех пор этот вирус постоянно выявляется у различных сортов картофеля. Вирус распространен повсеместно, где возделывается эта культура. Степень его распространения сейчас небольшая, что связано с внедрением в производство картофеля безвирусной системы семеноводства.

Род *Enamovirus*

Вирус деформирующей мозаики гороха 1

*Pea enation mosaic virus 1*

В род *Enamovirus* на сегодняшний день включен только один вид – вирус деформирующей мозаики гороха 1 (ВДМГ 1). Поэтому данные по характеристике рода относятся к его единственному представителю. Вирус имеет вирионы 28 нм в диаметре.

ВДМГ 1 содержит 180 субъединиц ( $T = 3$ ), м.м. –  $5,6-5,7 \times 10^6$ ,  $S_{20,W} - 107-122 S$  в разных изолятах, плавучая плотность в CsCl –  $1,42 (M) \text{ г/см}^3$ .

Вирионы представлены одной геномной РНК (ранее она обозначалась как РНК1 РЕМV) размером 5705 нт. На 5'-конце РНК находится VPg с м.м. 3138 кДа, последовательность составляющих его 28 аминокислот не имеет сходства с VPg полеровирусов. Структурный белок имеет м.м. 21 кДа; в вирионах изолятов вирусов, передающихся тлями, содержится также минорный белок 54 кДа. В геномной РНК располагаются 5 ОРС. ОРС 1 кодирует белок м.м. 34 кДа и перекрывается с ОРС 2, кодирующей белок 84 кДа; оба эти белка выявляются при трансляции РНК *in vitro*. Белок, связанный с геномом (VPg), кодируется нуклеотидами 1811–1894 внутри ОРС 1, которая также содержит протеиназный мотив. Возможно, что VPg образуется при пострепликационном протеолитическом процессинге полипротеина, мембранносвязанного комплекса протеиназа–VPg-полимераза, кодируемого ОРС 1 и ОРС 2. ОРС 3 перекрывается с ОРС 2 и кодирует белок 67 кДа, который, возможно, образует белок 130 кДа со свойствами РНК-зависимой РНК-полимеразы совместно с белком 84 кДа (продукт ОРС 2) при трансляционном сдвиге рамки. ОРС 4 кодирует белок оболочки 21 кДа и при просчитывании ОРС 5 образует структурный белок 54 кДа. Оба белка транслируются с субгеномной мРНК. Геномная РНК1 РЕМV способна к самостоятельной репликации в протопластах, однако для системной инфекции необходимо присутствие РНК умбравируса *Pea enation mosaic virus 2*. Только совместное присутствие этих двух вирусов способно вызвать в растениях деформирующую мозаику с образованием полноценных вирионов, механическую передачу вирусной инфекции и передачу насекомыми. При этом РНК1 РЕМV обеспечивает оба вируса структурными белками, VPg и способностью к передаче тлями, механическая передача кодируется геномом РЕМV-2 (цит. по: В.Г. Краев, 2001).

Круг растений-хозяев – узкий и ограничен видами в основном семейства *Fabacea*. Вирус поражает ценные продовольственные бобовые культуры – горох, сою, кормовые культуры – бобы, люпин, клевер, люцерну и др., а также душистый горошек, донник. Наибольший экономический ущерб вирус наносит выращиванию бобов кормовых и гороха посевного. Семена больных бобов мелкие и имеют более интенсивную желтую окраску, чем семена здоровых растений. Симптомы на горохе проявляются в виде четкой крупной зональной мозаики, морщинистости и курчавости листьев и прилистников. С развитием болезни хлоротичные пятна на листьях становятся почти



белыми, прозрачными. Острая форма заболевания сопровождается резкой деформацией и уродливостью растений. Растениями-индикаторами являются горох (деформирующая мозаика) и душистый горошек (четкая мозаика и пестролепестность). Из тест-растений, не принадлежащих к семейству бобовых, диагностическими видами являются виды мари (Билай и др., 1988).

*Липидов и углеводов* не обнаружено.

Вирус – слабый иммуноген.

Характерной особенностью вируса является внутриклеточный синтез в ядре.

В природе ВДМГ 1 передается с тлями персистентно. Инкубационный период в переносчике 9–48 ч. Вирус сохраняется в переносчике 29 сут. Семенами не передается. Механической инокуляцией сока без абразивных материалов передается с трудом.

ТТИ в соке составляет 65 °С, ПРС – 10<sup>4</sup>, ПСИ – 4 сут.

Распространен вирус повсеместно в местах выращивания гороха и других бобовых растений, в бывшем СССР вирус был зарегистрирован в Украине, Молдавии, Литве и на Дальнем Востоке. В Приморском крае ВДМГ 1 был обнаружен на горохе в 1985 г. (Поливанова, Крылов, 1985). Вирионы имели сферическую форму. Биологическое тестирование с использованием специфических тест-растений было характерно для этого вируса, а реакция вируса в соке инфицированных растений с антисыворотками против вируса огуречной мозаики и вируса мозаики люцерны была отрицательной. Эти результаты свидетельствовали о моноинфекции. На горохе и бобах эти авторы отмечали характерные для вируса симптомы, описанные в литературе, – мозаика «окнами» и выросты с обратной стороны листа. Вирус легко заражал растения гороха посевного *Pisum sativum* нескольких сортов: Wisconsin Perfection, Foli, Horal. При дальнейших пассажах на горох и бобы концентрация вируса резко снижалась, тем не менее отмечено длительное время сохранения вируса в растениях клевера красного.

## Семейство Tombusviridae

Таксономическая структура семейства *Tombusviridae* в последние годы претерпела значительные изменения. В семейство включены 8 родов: ранее самостоятельные роды *Necrovirus*, *Machlomovirus* и *Dianthovirus*, а также роды, образованные после 1995 г. и сформированные из новых описанных вирусов, — *Avenavirus*, *Panicovirus* и *Aureusvirus*.

### Таксономическая структура семейства

#### Роды:

<i>Tombusvirus</i>	<i>Dianthovirus</i>
<i>Carmovirus</i>	<i>Avenavirus</i>
<i>Necrovirus</i>	<i>Aureusvirus</i>
<i>Machlomovirus</i>	<i>Panicovirus</i>

Названия семейства и родов являются аббревиатурами названий типовых вирусов рода либо растений-хозяев и характерных симптомов у них: *tombus* — от *tomato bushy stunt*; *carmo* — от *carnation mottle virus*; *necro* — от греческого слова *nekros* — мертвое тело (симптомы некротизации, типичные для растений-хозяев некривирусов); *machlomo* — от *maize chlorotic mottle virus*; *dianth* — от родового названия гвоздики *Dianthus*; *avena* — овса *Avenus*; *aureus* — от родового названия растения-хозяина типичного вида *Pothos latent virus* — *Scindapsus aureus*; *panico* — от родового названия проса *Panicum*.

**Свойства вирионов. Морфология.** Вирионы икосаэдрические ( $T = 3$ ) и состоят из 180 белковых субъединиц, имеют сферическую форму, зернистую поверхность и диаметр от 28 до 35 нм в зависимости от рода.

**Физико-химические и физические свойства вирионов.** М.м. вирионов у вирусов разных родов от 6,1 до  $8,9 \times 10^6$ , коэффициент седиментации  $S_{20,w}$  — 118–140 S, плавающая плотность в CsCl — 1,34–1,40 г/см<sup>3</sup>. Вирионы стабильны при кислых значениях pH, устойчивы к повышенным температурам, нечувствительны к органическим растворителям, стабилизируются двухвалентными катионами.

**Нуклеиновая кислота.** Одна–две молекулы линейной (+)онРНК имеют длину от 3,7 до 4,7 т.п.о. в зависимости от рода. 3'-конец не полиаденилирован. Кеп структура на 5'-конце РНК имеется только у типового рода *Carmovirus* — вируса крапчатости гвоздики *Carnation mottle virus* и у диантовидов *Dianthovirus*.

**Белки.** Один капсидный белок м.м. 25–43 кДа (в зависимости от рода). Неструктурные белки: белок 28–33 кДа и большой полипептид 88–92 кДа (томбусвирусы, кармовирусы), который содержит полимеразный мотив GDD и два мотива NTP-связывающих белков геликазы. Кроме того, неструктурными белками являются



полипептиды с м.м. 8 и 9 кДа у кармовирусов, 19 и 22 кДа у томбусвирусов и 14 кДа у ауреусвирусов, все они выполняют транспортную функцию.

*Липидов и углеводов* вирионы не содержат.

**Организация генома и репликация.** Геном вируса содержит четыре–пять ОРС. Репликация происходит в цитоплазме, возможно, в мембранных везикулах эндоплазматического ретикулума или модифицированных органеллах – пероксисомах, митохондриях и иногда в хлоропластах. У нескольких родов продукты 5'-проксимальных ОРС 1 или 2 экспрессируются при трансляции геномной РНК, а продукты 3'-проксимальных ОРС 3, 4 или 5 – посредством трансляции субгеномных РНК. В инфицированной ткани присутствуют днРНК, соответствующие по размерам вирусной геномной и субгеномным РНК. Вирионы собираются в цитоплазме, изредка – в митохондриях и ядре. Иногда вирионы образуют кристаллические образования в цитоплазме и вакуолях.

**Антигенные свойства.** Вирионы являются активными иммуногенами. В тестах иммунодиффузии антисыворотки дают одну линию преципитации.

**Биологические свойства.** Круг растений-хозяев у разных родов либо ограничен двудольными или однодольными растениями, либо включает растения из разных семейств. В эксперименте список растений значительно расширен. Инфекция часто локализуется в корневой системе, а при системном распространении выражается в виде пятнистости, скручивания и деформации листьев. Некоторые вирусы заражают растения бессимптомно. ТТИ свыше 80 °С.

Все вирусы передаются механической инокуляцией и при вегетативном размножении, некоторые виды семейства – контактно и семенами. Вирусы часто обнаруживаются в природной среде – в поверхностных водах, почве – и могут инфицировать растения без участия переносчиков. Некоторые вирусы этого семейства переносятся грибами рода *Olpidium* и жуками.

Многие вирусы этого семейства широко распространены в умеренных географических регионах. Махломовирусы и кармовирусы, поражающие бобовые растения, чаще выявляются в тропиках.

### Род *Necrovirus*

Род немногочислен и представлен двумя видами – типовым вирусом некроза табака *Tobacco necrosis virus* и вирусом некроза хеноподиума *Chenopodium necrosis virus*, а также предполагаемыми видами рода – вирусом желтой полосатости гвоздики *Carnation yellow stripe virus* и вирусом некроза лизиантуса *Lisianthus necrosis virus*.

Вирионы 28 нм в диаметре. Им сопутствует вирус-сателлит с диаметром 16,8 нм с икосаэдрической симметрией (Т=1). М.м. вириона –  $7,6 \times 10^6$ ,  $S_{20,w}$  – 118 S, плавучая плотность в  $\text{CaCl}_2$  – 1,40 г/см<sup>3</sup>. Вирионы обоих видов рода устойчивы к эфиру, хлороформу и неионным детергентам, ТТИ – 85–95 °С, изоэлектрическая точка – рН 4,5.

Одна молекула линейной геномной РНК имеет длину 3759 нт., РНК сателлитного вируса – 1239 нт. и не имеет 3'-концевого поли(А) и 5'-концевого кэпа или VPg.

Геномная РНК имеет 5 ОРС, однако штамм А содержит 3'-проксимальную ОРС 6. ОРС 1 кодирует пептид 23 кДа. При просчитывании амбертерминирующего кодона ОРС 1 происходит трансляция ОРС 2 с образованием полипептида 82 кДа, который считают полимеразой, выявляемой в инфицированных растениях. ОРС 3 может кодировать белок 7,9 кДа, ОРС 4 – белок 6,2 кДа. ОРС 5 кодирует капсидный белок 30 кДа, который имеет 268–275 аминокислот и транслируется субгеномной РНК 1,3 т.п.о., а продукты ОРС 3 и 4 – с субгеномной РНК 1,6 т.п.о. Репликация сателлитного вируса, РНК которого содержит лишь одну ОРС для капсидного белка, зависит от вируса-хелпера. Вирионы вируса некроза табака и сателлитного вируса образуют в инфицированных клетках кристаллические агрегаты. Вирусы имеют широкий круг растений-хозяев как двудольных, так и однодольных. Инфекция, как правило, локализуется в корнях растений. В лабораторных условиях при инокуляции тест-растений обычно образуются местные некрозы на инокулированных листьях, редко наблюдается системная реакция. Передаются вирусы этого рода экспериментально механической инокуляцией, а в природе – грибом *Olpidium brassicae* (описание семейства и рода цит. по: В.Г. Краев, 2001). На ДВР идентифицирован типовой вид рода некривирусов – вирус некроза табака на декоративных культурах.

### Вирус некроза табака *Tobacco necrosis virus*

Впервые симптомы болезни, вызываемые вирусом, были описаны в Голландии в 1931 году при выявлении их на растениях тюльпанов сорта *Augusta*, откуда и произошло название «августовская болезнь» (Путнаэргле, 1976). Симптомы заболевания, вызываемые вирусом, были очень яркие, со временем увеличивались в размерах, что иногда приводило к гибели растений в начале вегетации. На листьях наблюдали штрихи или полосы, листья сворачивались и засыхали. Бутоны больных растений не распускались или образовывали мелкие цветки с некротическими штрихами. Иногда встречались растения, у которых поражена была только одна половина, другая оставалась нормальной. Таким образом, вирус резко влиял на внешний вид растения, а следовательно, и товарные качества. В 1949 году английские и голландские исследователи показали, что это заболевание тюльпанов вызывается вирусом некроза табака (Outober, Van Slogteren, 1949; Kassanis, 1949). Позднее ВНТ был обнаружен на флоксах, петунии, нарциссах и других декоративных растениях. Затем вирус некроза табака (ВНТ) был описан в Англии (Smith, Bald, 1935) как возбудитель некроза нижних листьев и стеблей табака. Впоследствии аналогичные симптомы, вызываемые вирусом, были обнаружены на растениях фасоли (Behncken, 1968), огурцов (Koot, Derst, 1959), томатов (Thung, 1957), картофеля (Gold., 1960), гречихи (Buturovic, Grbeolija, 1978), примулы *Primula obconica* (Mokra, 1960) и фруктовых деревьях (Paulechova, Baumgartnerova, 1980).

**Свойства вирионов.** Своеобразные свойства вирус проявляет во взаимоотношении с вирусом-сателлитом и с грибом рода *Olpidium brassicae*, являющимся переносчиком вируса. ВНТ имеет изометрические многогранные частицы диаметром



26–28 нм, состоящие из одноцепочечной РНК с м.м. 1,3–1,6 мДа и белка м.м. 22,6 кДа (Lesnaw, Reichmann, 1969; Kassanis, 1970). Коэффициент седиментации – 118 S, плавающая плотность в CsCl – 1,399 г/см<sup>3</sup>. Вирионы стабильны при pH 4,5 (штамм В).

Имеет 5 ОРС, м.м. которых 23, 82, 79, 62 и 30 кДа соответственно. Вызывает интерес сателлит ВНТ (СВНТ). Структура СВНТ была определена кристаллографически. Изометрические частицы СВНТ с м.м. 16 кДа и диаметром 17 нм, состоят из одноцепочечной РНК с м.м. 3,4 мДа и белка, м.м. которого равна 21,6 кДа. Отмечено, что ВНТ и СВНТ отличаются по симптоматологии, антигенным свойствам и аминокислотному составу (Kassanis, 1970; Liljas, Unge, 1982).

**Антигенные свойства.** ВНТ относят к активным иммуногенам, и как антиген он четко реагирует со специфическими антителами в различных иммунохимических реакциях (Гнutowa, 1993; Gnutowa, Tolkach, 2005). В коммерческих целях для иммунодиагностики вируса с помощью ИФА в настоящее время получают поликлональные антитела к ВНТ типа А (изолят из томата) и ВНТ типа Е (изолят из вишни).

**Биологические свойства.** Круг растений-хозяев вируса довольно широк – приблизительно 88 видов из 37 семейств (Метьюз, 1973), в том числе *Caprifoliaceae*, *Cucurbitaceae*, *Moraceae*, *Solanaceae* и др. ВНТ вызывает на растениях повреждения преимущественно некротического типа. На листьях растений вигны и фасоли образуются местные некрозы, цвет которых варьируется в зависимости от изолята вируса от белого (вигна) до красновато-коричневого (вигна, фасоль). В естественных условиях вирус обнаружен в корнях томатов, фасоли, земляники, нарциссов, табака и др. В некоторых случаях у инфицированных растений наблюдали некротизацию тканей корней. На листьях зараженного картофеля симптомов обычно не бывает, а на кожуре клубней наблюдаются сетчатые темно-коричневые трещины и обычно округлые некрозы, которые усиливаются при хранении и могут покрывать весь клубень. Иногда при уборке клубней и в период их хранения наблюдаются вздутия, напоминающие паршу (Блоцкая, 2000). Вирус в зависимости от штамма снижал урожай картофеля от 15 до 70%.

ТТИ – 72–85 °С, ПРС – 10<sup>-4</sup>–10<sup>-6</sup>, ПСИ – 20 сут.

**Передача.** Передается механическим путем и с большим трудом прививкой. Семенами и пылью не передается. Долгое время о переносчиках ВНТ в природных условиях ничего не было известно. Только после того как было установлено, что ВНТ в корнях салата-латука передается посредством зооспор гриба рода *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang (Fry, Campbell, 1966; Kassanis, 1970), начались исследования по выявлению спорангий гриба в корнях тюльпанов (Teakle, 1962). Они оказались безуспешными, но это натолкнуло исследователя на мысль, что именно сам гриб является переносчиком вируса даже на такие растения, в корнях которых он не паразитирует. Эффективность передачи вируса, как указывают авторы, зависит от способности вирионов прикрепляться к поверхности внешней мембраны зооспор. Вирионы адсорбируются на поверхности зооспор, и при втягивании жгутика часть их попадает внутрь зооспоры. *O. brassicae* формирует несколько поколений зооспорангиев при влажности почвы

более 40%. Зооспоры с током воды перемещаются от растения к растению, распространяя вирусную инфекцию, поэтому вирус вызывает заболевание растений чаще всего в сырых песчаных почвах с кислой средой. Таким образом, гриб живет в корнях сорняков и культурных растений – картофеля, шпината, сахарной свеклы и др.

Вызываемые этим вирусом заболевания наносят большой экономический ущерб.

При обследовании декоративных растений в цветоводческих хозяйствах Приморского края из нарциссов с симптомами хлоротичной штриховатости был впервые выявлен ВНТ на ДВР (Сибирякова и др., 1987). Для идентификации были привлечены индикаторный, электронно-микроскопический и иммунохимический методы. Определялись физические свойства ВНТ – температура инактивации вирионов и устойчивость вируса в соке пораженного растения. Изучались иммуногенные и анти-

Таблица 16

Реакция тест растений на заражение вирусом некроза табака

Вид и сорт растений	Время появления симптомов после инокуляции вирусом, сут	Симптомы вирусного поражения
<i>Antirrhinum majus</i>	6–7	L: NSp
<i>Amaranthus caudatus</i>	6–7	-»-
<i>Callistephus chinensis</i>	4–5	-»-
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	2–3	-»-
<i>Ch. quinoa</i>	5	-»-
<i>Ch. murale</i>	2–3	-»-
<i>Cucumis sativus</i> , сорт Дальневосточный 6	4–6	-»-
<i>Datura stramonium</i>	3–5	-»-
<i>Gomphrena globosa</i>	5	-»-
<i>Lathyrus sativum</i>	5	-»-
<i>Lycopersicon chinense</i> , сорта: Daka	5	-»-
Подарок	5	-»-
<i>Nicotiana tabacum</i> , cv. Samsum	3–6	-»-
<i>N. tabacum</i> , cv. Xanthi	3–6	-»-
<i>N. rustica</i>	3–6	-»-
<i>Nicandra physaloides</i>	4–5	L: ClSp
<i>Petunia hybrida</i> , cv. Primadonna	3–5	L: NSp
<i>Phaseolus vulgaris</i> , cv. Beka	3	-»-
<i>P. vulgaris</i> , cv. Saxa	2	-»-
<i>Pisum sativum</i> , сорт Степной	3–6	-»-
<i>P. sativum</i> , cv. Matador	3–6	-»-
<i>Spinacia oleracea</i>	6–7	-»-
<i>Tetragonia expansa</i>	6	-»-
<i>Vicia faba</i> , cv. Black eye	6	-»-
<i>Zinnia elegans</i>	6	-»-



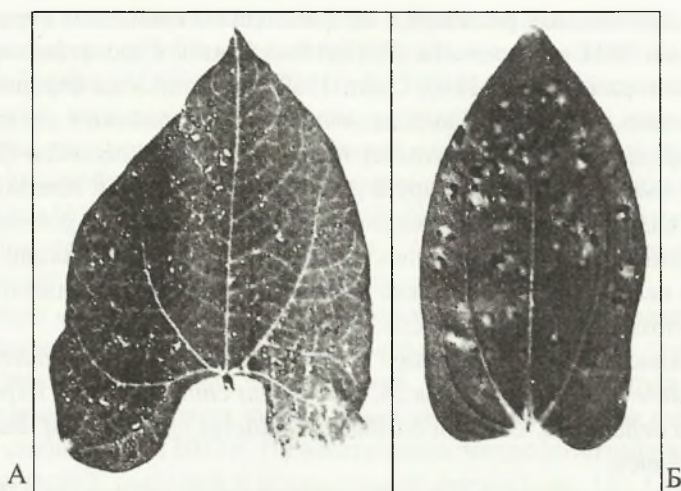


Рис. 16. Симптомы, вызываемые ВНТ, у фасоли обыкновенной (А) и у циннии элегантной (Б)

генные свойства вируса, подбирались оптимальные методики получения очищенного препарата и противовирусной сыворотки для сравнительной характеристики дальневосточного и латвийских изолятов вируса, выделенных из тюльпанов (ВНТТ).

Для изучения круга поражаемых вирусом растений заражали растения 37 видов и сортов из семейств *Aizoaceae*, *Asteraceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Scrophylariaceae*, *Solanaceae* (табл. 16), на 26 из них была реакция только локального характера в виде хлоротических и некротических пятен (рис. 16, 17).

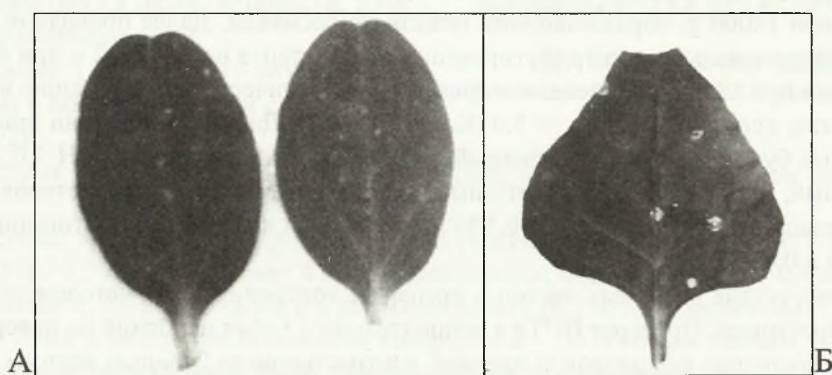


Рис. 17. Симптомы ВНТ на листьях растений огурца (А) и *Tetragonia expansa* (Б)

По кругу поражаемых растений и по физическим свойствам вирионов дальневосточный изолят ВНТ из нарциссов (ВНТн) был близок к изолятам вируса, описанным другими авторами (Price, 1940; Смит, 1960), но отличался большей стабильностью по сравнению, например, с выделенными ранее латвийским изолятом из тюльпанов (Путнаэргле, 1976) и чешским из примулы *Primula obconica* (Мокра, 1960). Проведенные опыты по изучению круга растений-хозяев ВНТн показали, что к диагностическим видам наиболее подходят *Ch. quinoa*, *Gomphrena globosa*, *P. vulgaris*. Симптомы на этих растениях появлялись на 2–3 день после инокуляции. На *Nicotiana tabacum* также наблюдали очень четкие симптомы вирусного поражения, но они появлялись чуть позже, на 3–6 день после заражения ВНТн.

Не заражались вирусом: *Medicago sativa*, *Solanum nigrum*, *Papaver somniferum*, *Trifolium hybridum* сорта Приморская 28, *Calistephus chinensis* сорта Карликовая королевская, *Atropa belladonna*, *Ocimum basilicum*, *Melilotus officinalis*, *M. indica*, *M. albus*, *Lychnis chalconica*.

ВНТн хорошо размножался и накапливался в растениях *Ch. quinoa* Willd., *Cucumis sativus* L. сорта ДВ 6, *Phaseolus vulgaris* L., *N. tabacum* L. cvs. Samsun, Xanthi.

Определены физические свойства вирионов в соке растений огурца, зараженно-го ВНТн. ТТИ – 85 °С, ПСИ – 30 сут. В качестве сравнения приведем эти показатели для латвийского изолята ВНТ: ТТИ – 78–80 °С, ПРС –  $10^3$ – $10^4$ , ПСИ – до 15 сут при температуре 18–20 °С (Путнаэргле, 1976).

Для получения препарата ВНТн использовали листья зараженных растений с некрозами. Сравнивали несколько методик очистки вируса, предложенных другими исследователями, и нашу методику, которая заключалась в следующем. Свежесорванные листья гомогенизировали в экстрагирующем буфере (из расчета 1 мл на 1 г листьев). Осветление экстракта проводили хлороформом (1/7 от объема экстракта) в размельчителе тканей в течение 2–3 мин, затем центрифугировали 20–25 мин при 5000 g. К супернатанту добавляли 8 % ПЭГ и 0,25 % NaCl и оставляли на 4–5 ч при 4 °С, затем центрифугировали в течение 20 мин при 1800 g. Осадок ресуспендировали в экстрагирующем буфере 2–3 ч, затем центрифугировали вируссодержащую суспензию 20 мин при 18000 g, образовавшийся осадок отбрасывали. Далее проводили 2-кратное дифференциальное центрифугирование супернатанта в течение 2 ч при 40000 g, 10–15 мин при 18000 g. Определяли спектрофотометрически концентрацию вируса в препаратах, используя  $E_{0,1\%}^{260} = 5,0$  (Kassanis, 1970). Для гомогенизации применяли различные буферы: 0,01 М фосфатный, pH 6,2; 0,06 М фосфатный, pH 7,0; 0,05 М фосфатный, pH 7,5; 0,2 М Na-ацетатный, pH 5,0. В качестве стабилизаторов вируса использовали 0,05 %  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0,1–0,3 % аскорбиновой кислоты, 0,1 % тиогликолевой кислоты и 0,01 М ЭДТА.

Присутствие вирусных частиц в препарате контролировали методом электронной микроскопии. Препарат ВНТн в концентрации 1 мг/мл наносили на поверхность сеточек, покрытых формваровой пленкой, контрастировали 2 %-ным водным раствором уранилацетата и просматривали в электронный микроскоп ЭВМ-100 Л при увеличении до 41000.



Лучшие результаты были получены при использовании для гомогенизации 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,2, содержащего 0,1 % тиогликолевой кислоты и 0,2 М Na-ацетатного буфера, рН 5,0, содержащего 0,1 % аскорбиновой кислоты. Осветление вирусосодержащей жидкости хлороформом и концентрирование вируса с помощью ПЭГ и дифференциального центрифугирования позволило получить препараты ВНТн относительно высокой степени очистки, которые имели типичный спектр поглощения нуклеопротеида в УФ области с максимальной абсорбцией при 260 нм и минимальной при 240 нм. Пропорциональность абсорбции —  $A_{260/280} = 1,2-1,4$ . Выход вируса составил около 50 мг/кг (изолят ВНТн, выделенный из *Ph. vulgaris*).

Мы провели сравнительный анализ полученных вирусных препаратов, используя для выделения вируса свежесорванные листья и подвергнутые длительному хранению путем замораживания или высушивания. Концентрация вируса и морфология частиц в очищенных препаратах существенно не отличались, что свидетельствовало о высокой стабильности ВНТн. На электронных микрофотографиях наблюдались частицы сферической, овальной и неправильной формы (рис. 18). Средний диаметр частиц округлой формы —  $28 \pm 0,8$  нм. Изменение формы частиц и отсутствие в полученных препаратах частиц у вируса-сателлита (СВНТ), вероятно, связано с жесткими методами выделения вируса.

Для получения кроличьей поликлональной Ас с высоким содержанием специфических антител были испытаны 5 схем иммунизации животных. Для стимуляции иммунного ответа на введение вируса во всех схемах использовался полный адьювант Фрейнда (Дифко, США).

1 схема: 1-й день — внутрикожное (в/к) введение вируса с адьювантом ( $v/v = 1/2$ ) в несколько точек вдоль позвоночника и по боковым линиям тела животного, 8-й день — подкожное (п/к) в паховые области, 23-й — п/к в подколенные ямки.

2 схема: 1, 8, 23-й дни — внутримышечное (в/м) в обе задние лапки с адьювантом ( $v/v = 1/2$ ).

3 схема: 1, 8, 23-й дни — внутривенное (в/в) в краевую ушную вену без адьюванта.

4 схема: в/в введение вируса в краевую ушную вену без адьюванта: 1-й день — 0,1 мг; 2-й — 0,2 мг; 3-й — 0,3 мг; 4 и 5-й — дни отдыха; 6-й — 0,4 мг; 7-й — 0,5 мг.

5 схема: 1, 14-й дни — в/к и п/к введение вируса (0,5 мг) с адьювантом ( $v/v = 1/2$ ) в 20–30 точек в местах расположения лимфоузлов — по боковым линиям, вдоль позвоночника, в подколенные ямки, паховые области, подушечки лапок и в шейную область. Результаты иммунизаций животных ВНТ по 5 схемам представлены в таблице 17.

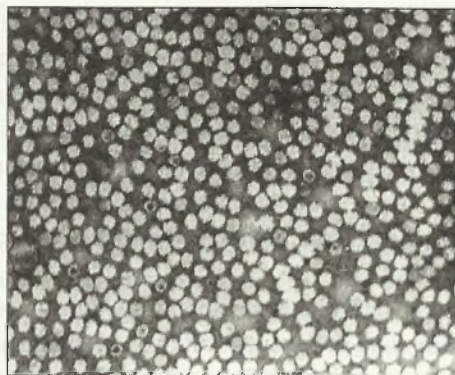


Рис. 18. Электронная микрофотография частиц ВНТ (фото Н.В. Рублевой)

Влияние дозы и способа введения ВНТн на титр специфических антител

Схемы иммунизации	Способы введения иммуногена	Дозы иммуногена (мг)	Титр антисывороток в РДД
1	в/к, п/к	0,6 (0,2×3)*	1:2048
1	->-	3 (1×3)	1:256
2	в/м ->-	0,6 (0,2×3)	1:256 1:2048
3	в/в ->-	1,5 (0,5×3) 3 (1×3)	1:128 1:2048
4 (ускоренная) реимунизация на 60-й день	в/в в/в	1,5 (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5) 0,5	1:16 1:128
5	в/к, п/к	1 (0,5×2)	1:2048

\*За скобками дана общая доза иммуногена, в скобках – разовая доза.

По каждой схеме иммунизировали 2 группы животных. Первой группе за одну инъекцию вводили 0,2 мг вируса (общая доза – 0,6 мг), второй – 1 мг (общая доза – 3 мг). Взятия крови по всем схемам проводились на 7, 9, 11-й дни после последней иммунизации, а затем через каждые 5 дней для определения динамики накопления специфических антител в крови иммунизированных животных к исследуемому вирусу. Титр Аг определяли РДД. Для постановки РДД использовали 1 %-ный бакто-агар (фирма Ferrak, Берлин) в буфере, используемом для выделения вируса с добавлением 1,5 % ПЭГ.

ВНТн являлся хорошим иммуногеном. Эффективность иммунизации напрямую зависела от выбранной схемы, способа введения иммуногена и количества вводимого препарата. Микродозы (0,2 мг × 3) при п/к и в/к способах введения иммуногена в места расположения лимфоузлов способствовали получению Ас с высоким содержанием специфических антител – 1:2048 (рис. 19).

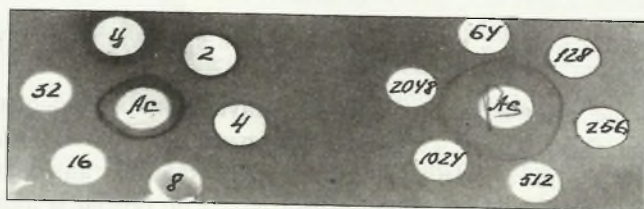


Рис. 19. Титр специфических антител в антисыворотке против ВНТн в РДД. В периферических лунках – разведение гомологичной Ас в геометрической прогрессии (1:2, 1:4, 1:8 и т.д.), в центральных – препарат ВНТн (1 мг/мл)



Увеличение дозы иммуногена (1,0 мг × 3) не только не способствовало повышению уровня антител в крови иммунизированных животных, а наоборот, приводило к угнетению антителообразования. Титр полученной Ас по результатам РДД – 1:256. При в/м и в/в способах введения микродоз (0,2 мг × 3) иммуногена было недостаточно для получения высокоактивных диагностических антисывороток.

Получены поликлональные антисыворотки с титрами – 1:256 при в/м введении ВНТ и 1:32 при в/в. Невысокий уровень специфических антител в крови животных – 1:16 также наблюдали при иммунизации животных в/в по ускоренной схеме. Реиммунизация животных (0,5 мг вируса внутривенно) на 60-й день после последней инъекции увеличивала титр антител в антисыворотках до 1:128. Введение макродоз ВНТ в/в и в/м было эффективно (1,0 мг × 3), так как антисыворотки имели высокий титр – 1:2048. Такой же титр Ат выявили у антисывороток, приготовленных по 5-й схеме иммунизации, которая, на наш взгляд, лучше всего подходила для получения активной антисыворотки к ВНТн. Преимущество ее заключалось в малом количестве иммунизаций (2) и небольшом расходе иммуногена (1 мг).

Изучена динамика накопления антител в крови иммунизированных животных по результатам РДД. Показано, что при иммунизации животных по 1, 2 и 5-й схемам максимальное количество антител (титр сыворотки – 1:2048) отмечено на 7 день после последней инъекции и сохранялось на высоком уровне 15–20 дней при введении иммуногена п/к и в/к и 10–15 дней при введении в/м. При в/в способе введения вируса (3 и 4-я схемы) максимальная концентрация Ат была отмечена на 10 день после последней инъекции и сохранялась на этом уровне 5–10 дней. В течение последующих 30–50 дней титр антител в сыворотке медленно снижался, а на протяжении последующих 20–30 дней оставался невысоким, но постоянным – у кроликов, иммунизированных в/м – 1:64, в/в – 1:8.

РИД позволила определить концентрацию ВНТн в соке зараженных растений, в которых накапливали вирус для получения очищенных препаратов. Лучшие результаты при постановке реакции были получены с 1 %-ным агаром (Дифко, США) в 0,01 М фосфатном буфере, рН 6,2. Содержание антисыворотки в геле составило 5 %. Используя препараты вируса с известной концентрацией, строили калибровочные кривые, а затем по графику определяли концентрацию вируса в опытных образцах. По результатам РИД установили, что содержание вируса в 1 мл сока семядольных листьев *C. sativus* с некрозами ВНТ составило 0,88 мг, в 1 мл сока *Ph. vulgaris* – 0,64 мг. В нашей модификации для постановки РИД испытывали агар двух фирм США – бактоагар (0,8 %-ный) и дифко (1 %-ный) в следующих растворах: 0,85 % NaCl в воде, 0,01 М фосфатный буфер, рН 6,2; 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,5; 0,05 М боратный буфер, рН 8,0; 0,2 М Na-ацетатный буфер, рН 5,0; 0,1 М веронал-мединаловый буфер, рН 8,0. Консервантами служили 0,01 %-ный мертиолят или азид натрия. Для контроля специфичности антисывороток во всех опытах аналогичные реакции ставили с соком здоровых растений и цельной сывороткой неиммунизированного животного.

Итак, для ВНТн был выявлен круг растений-хозяев и симптоматология заболевания, изучены физические параметры вирионов (ТТИ, ПСИ), подобрана оптимальная

методика получения очищенного препарата и схема иммунизации. ВНТн отличался более высокой стабильностью по сравнению с другими изолятами, описанными в литературе, и являлся хорошим иммуногеном. Введение микродоз вируса (0,2–0,5 мг) при п/к и в/к было наиболее эффективно по сравнению с другими способами иммунизации. Это позволило получить антисыворотку с высоким титром антител (1:2048) и обеспечивало их длительное сохранение на высоком уровне в крови иммунизированных животных.

Выявление идентичных видоспецифических эпитопов КБ дальневосточного и латвийских изолятов ВНТ (ЛСХА, г. Елгава), идентифицированных из растений огурца и выделенных из почвы, проводили с помощью РДД. Применяли антисыворотки ко всем исследуемым изолятам ВНТ. Сравнительное изучение антигенного родства изучаемых изолятов ВНТ показало, что они имеют идентичные эпитопы (рис. 20).

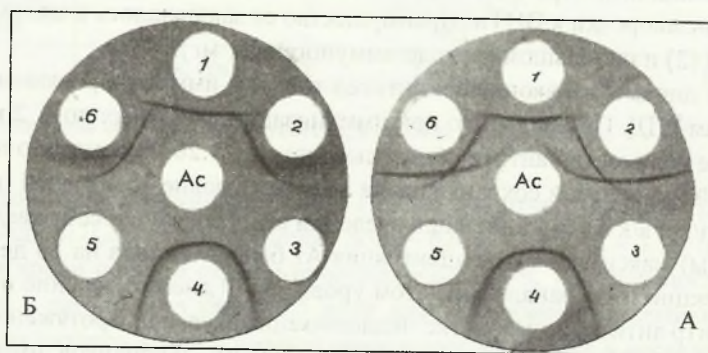


Рис. 20. Определение антигенных взаимоотношений в РДД дальневосточного и латвийских изолятов ВНТ. А – в центральных лунках – Ас к ВНТн; в периферических: 1, 4 – сок из листьев фасоли, инфицированной ВНТн; 2, 6 – сок из мари квиноа, зараженной латвийским изолятом ВНТ из огурца; 3, 5 – Ас к изоляту ВНТ из огурца. Б – все то же, только вместо изолята ВНТ из огурца изолят ВНТ из почвы и специфическая к нему Ас

Как видно из рис. 20, между ВНТн и латвийским изолятом ВНТ из огурца и специфическими антисыворотками наблюдалась реакция частичной идентичности, что указывало на наличие родо- и видоспецифических эпитопов КБ. Иммунный комплекс, сформированный в виде полос преципитации в РДД между почвенными изолятами ВНТ и гомологичными и гетерологичными антисыворотками, выявлен как перекрещивающиеся линии. Этот результат свидетельствовал о различии эпитопов КБ сравниваемых изолятов вируса (слабые вторые полосы преципитации у лунок с антисыворотками к латвийским изолятам). Идентичные эпитопы КБ способствовали получению к ним антител, возможно, к специфичным конформационным (скрытым) эпитопам. Тем не менее не исключен и другой вариант, свидетельствующий о том, что линии преципитации в РДД могли быть образованы вирусом-сателлитом, который присутствовал в препарате ВНТн в минимальных количествах, что связано



с жесткими методами очистки. При получении антисывороток к латвийским изолятам ВНТ использовались более щадящие методики очистки вируса (Икаunieце, 1976; Миглавс, Икаunieце, 1983), поэтому в препаратах, используемых для иммунизации, присутствовало значительное количество СВНТ и, как результат, выявилось наличие в полученных антисыворотках специфичных к нему антител. СВНТ благодаря своим размерам быстро проходит через поры агара в РДД, образуя свою линию преципитации, расположенную ближе к лунке с антисывороткой. Известно, что СВНТ имеет антигенные детерминанты, по структуре и специфичности неродственные антигенным детерминантам ВНТ. Установлено, что СВНТ отличался от ВНТ по антигенным свойствам и аминокислотному составу (Kassanis, 1970; Liljas et al., 1982). Поэтому вторая линия преципитации между лунками образовывалась с почвенными изолятами ВНТ и гомологичными антителами, а также с СВНТ и гомологичными антителами. В антисыворотке, полученной к дальневосточному изоляту ВНТн, практически отсутствовали Ат к СВНТ, и гомологичные и гетерологичные антисыворотки образовали перекрестные линии преципитации.

Итак, полученные данные свидетельствовали о частичном антигенном родстве дальневосточного и латвийских изолятов ВНТ. Наиболее близок по антигенным свойствам к дальневосточному изоляту был латвийский изолят, поражающий растения огурцов, а не изоляты, вызывающие заболевание посредством передачи вируса на растения почвенным грибом *Oplidium brassicae*.

## Семейство Bromoviridae

Таксономическая структура семейства (Fauguet et al., 2005)

### Роды:

*Alfamovirus*    *Bromovirus*    *Cucumovirus*  
*Ilarvirus*    *Oleavirus*

Происхождение названий семейства и родов. Род *Bromovirus*, давший название семейству, произошел из названия растения-хозяина вируса мозаики кофры – *Bromus* (кофр) и симптомов, которые вызывает этот вирус – *mosaic virus*; род *Ilarvirus* – от слов: сферический *isometric*, неустойчивый (лабильный) *labil* и кольцевая пятнистость *ringspot*; род *Cucumovirus* – от *cucumber mosaic virus*; род *Oleavirus* – от *Olea*, – т. е. маслины, растения-хозяина типового вида рода латентного вируса маслины 2 *Olive latent virus 2*.

**Свойства вирионов.** Частицы вирусов родов *Bromo-*, *Cucumo-* и *Ilarvirus* имеют сферическую форму диаметром 26–35 нм, икосаэдрическую симметрию ( $T = 3$ ), содержат три геномных и одну субгеномную онРНК: РНК 1 и РНК 2 находятся в разных частицах, а РНК 3 и субгеномная РНК 4 – в одной частице. Вирионы родов *Alfamovirus* и *Oleavirus* квазисферические или бациллоподобные с диаметром 18 нм и длиной 30–57 нм. Три вида разных по размерам вирионов альфамовирусов содержат по одной копии РНК 1(В), РНК 2(М) и РНК 3(Тб), а четвертый вид – две копии РНК 4. Частицы олеавирусов инкапсидируют также четыре вида РНК, но не содержат субгеномной мРНК белка оболочки.

**Физико-химические свойства.** М.м. вирионов неодинакова и зависит от составляющих их РНК и белка; у разных родов она варьируется от 3,5 до 6,9 мДа. Плавучая плотность вирионов, фиксированных альдегидами, в CsCl – 1,35–1,37 г/см<sup>3</sup>, частицы разрушаются нейтральными хлоридами и ДСН. РНК *in situ* чувствительна к РНКазе при нейтральных значениях pH,  $S_{20,w}$  вирионов 73–99 S. Содержание РНК – от 14 до 25 %.

**Нуклеиновая кислота.** Геном состоит из трех молекул линейной (+)онРНК 1 (2940–3644 нт.), РНК 2 (2600–3057 нт.), РНК 3 (2037–3057 нт.) и РНК 4 (800–1000 нт.), которая является субгеномной мРНК белка оболочки, транскрибируется с РНК 3 и инкапсидируется в вирионы (кроме субгеномной РНК олеавирусов, у которых инкапсидируется РНК 4 размером 2078 нт. с неизвестными функциями). Все РНК кепированы на 5'-конце, поли(А) на 3'-конце отсутствует, а у бромо- и кукумовирусов выявлены здесь тРНК-подобные структуры.

Вирусы имеют один белок оболочки м.м. 20–26 кДа. У сферических вирусов он представлен 180 субъединицами в виде пентамеров и гексамеров.

**Липидов и углеводов** вирионы не содержат.

**Организация генома и репликация.** РНК 1 и РНК 2 кодируют по одному белку соответственно 110–126 кДа и 90–95 кДа со свойствами полимеразы и геликазы. РНК 3



дицистронна и кодирует транспортный белок 30–35 кДа и белок оболочки 20–26 кДа, который транслируется *in vitro* и *in vivo* с субгеномной РНК. Геномные РНК реплицируются через минус-нить полной длины в цитоплазматических мембранносвязанных структурах с участием вирусных репликаз и клеточных компонентов. Для узнавания репликазой бромовирусов и кукумовирусов необходим интактный 3'-конец РНК, а альфамовирусов – специфическая ассоциация белка оболочки с 3'-концевыми последовательностями РНК. Вирионы собираются и аккумулируются в цитоплазме, иногда выявляются в вакуолях, образуя кристаллические и гранулярные включения.

**Антигенные свойства.** Вирусы этого семейства – умеренные или слабые иммуногены, стабилизация белковой оболочки возможна при фиксации альдегидами для усиления иммуногенных свойств. Роды не имеют антигенного родства.

**Биологические свойства.** Вирусы семейства широко распространены в мире, заражают много ценных и важных в экономическом плане культурных растений. Отдельные вирусы имеют либо ограниченный круг поражаемых растений, либо, наоборот, широкий. Передаются механически инокуляцией сока, кукумо- и альфамовирусы – многими видами тлей, некоторые из них и иларвирусы – семенами отдельных видов растений либо пылью (характеристика семейства цит. по: В.Г. Краев, 2001).

На Дальнем Востоке России идентифицированы вирусы трех родов этого семейства: *Bromo-*, *Alfamo-* и *Cucumovirus*.

## Род *Alfamovirus*

### Вирус мозаики люцерны *Alfalfa mosaic virus*

Типовой вид – вирус мозаики люцерны (ВМЛ) *Alfalfa mosaic virus* является единственным представителем рода. Вирус впервые описан в США (Weimer, 1931, 1934), имеет частицы бациллоподобной формы главным образом четырех размеров: 18 нм шириной и 30, 35, 43 и 56 нм длиной. Коэффициент седиментации – 94 S (В), 88 S (М), 78 S (Та), 66 S (Тв). Плавающая плотность вирионов, фиксированных альдегидами, в CsCl – 1,381 (Тг) и 1,385 (В) г/см<sup>3</sup>, рН 4,6.  $A_{max/min} = 1,7-1,8$ . Вирус осаждается при рН 6 и выше.

**Биологические свойства.** Круг растений-хозяев ВМЛ представлен более 300 видами растений из 47 семейств, в том числе *Compositae*, *Leguminosae*, *Solanaceae* и др. (Hull, 1969; Bos, Jaspars, 1971). Из культурных растений вирус поражает люцерну, сою, картофель, перец, томаты, горох, арахис, виноград, малину, хмель и др. Симптомы вирусного поражения разные – от ярких проявлений (мозаика до ярко-желтой деформация, задержка роста, кустистость, пожелтение листьев, иногда некрозы, правда, сильные некрозы встречаются редко) до латентного вирусоносительства в зависимости от штамма вируса, вида растения и условий выращивания. Например, на люцерне отмечают различные типы мозаик (от светло-зеленой до желтой) с неодинаковой степенью деформации листьев. На листьях перца и баклажана ВМЛ вызывает различные

типы пятнистости листьев (желтые, беловатые), у гороха – некротические локальные повреждения и/или увядание инокулированных листьев с некротической штриховатостью с последующим отмиранием растения. Характерные вирусные симптомы на растениях картофеля – крупные желтые неравномерно расположенные пятна или крапинки ярко-желтого, желто-белого или серого цвета, занимающие чаще всего долю листа. Встречается также некротический штамм, приводящий к гибели растения. Возможна латентная инфекция. Вредоносность не высокая (Анисимов, 2004).

Вирус может поражать сою и другие бобовые культуры. Из литературных источников известно, что инфекция на сою обычно передается с клеверов (*Trifolium pratense*, *Tr. perens*) и донников (Тахакаси и др., 1963; Тахакаси и др., 1969). На сое ВМЛ проявляется в виде слабой системной крапчатости. У некоторых сортов в полевых условиях на листьях появляются ярко-желтые пятна или оранжево-желтая окраска всей поверхности верхушечных листьев. В последнем случае одновременно наблюдается карликовость и курчавость листьев. В качестве примера приведем данные для узбекского изолята ВМЛ из сои (Горбунова и др., 1971). В условиях эксперимента этот изолят ВМЛ заражал некоторые виды табаков, в том числе табак *N. glutinosa*, бобы, дурман, томаты, марь и др. Симптомы ВМЛ на сое явно отличаются от симптомов, вызываемых ВМС и ВЖМФ – одних из основных вирусов, поражающих сою. При обнаружении на растениях признаков некротизации верхушки и опадения почек следует знать, что эти симптомы характерны для ВКПТ на сое. Поэтому следует учитывать, что подобные признаки заболевания на сое вызваны одним из двух вирусов – ВМЛ или ВКПТ. В Узбекистане ВМЛ был идентифицирован этими исследователями помимо сои также на люцерне, белом доннике, вигне и дурмане. По их данным, в растениях люцерны и белом доннике ВМЛ мог перезимовывать, а весной и летом переноситься на посевы сои, вигны и других восприимчивых к вирусу культурных растений. Поскольку вирус не передавался семенами, то главные его переносчики – тли. Поэтому следует считать, что решающим фактором распространения вируса на посевах сои является близость источника инфекции.

В качестве тест-растений ВМЛ обычно используются *N. tabacum* (желтые локальные пятна, посветление жилок, крапчатость), *Phaseolus vulgaris* (красно-коричневые некрозы, некроз сосудов, искривление листьев), *Faba bona* (изменение окраски листьев, некроз стебля, черные некротические локальные повреждения и отмирание растения). У люцерны и клевера ВМЛ не только снижает урожайность, но и предрасполагает к высуханию растений. Многие инфицированные вирусом растения в природе могут служить источником инфекции для других культур. Резерватором инфекции также являются многие сорные растения. Эпифитотии редки. Вирус распространен повсеместно.

ВМЛ передается инокуляцией сока и 13 видами тлей (*Macrosiphum pisi*, *M. solanifolli*, *Aphis gossypii*, *A. medicaginis*, *A. fabae*, *Myzus persicae* и др.) по непersistентному типу (Kennedy et al., 1962). Передача семенами изучена недостаточно, но есть данные о передаче вируса семенами люпина (Власов, Самсонова, 2005).

Вирус – умеренный иммуноген. Антигенные связи с другими вирусами не выявлены, но выявлено антигенное родство между изолятами вируса (Bancroft et al., 1960).



В Приморском крае ВМЛ впервые обнаружен на растениях клевера красного (Поливанова и др., 1977). Позже при обследовании овощных культур ВМЛ был выявлен на томатах и перцах, при этом вирус, как правило, в растениях присутствовал в смешанной инфекции с ВТМ (Теплоухова и др., 1987), в 90-е годы прошлого столетия ВМЛ был отмечен и на картофеле (Рейфман и др., 1996). При изучении круга растений-хозяев для дальневосточного изолята ВМЛ, выявленного на клевере красном, испытывались растения 64 видов из 10 семейств. ВМЛ заражал многие сорта сои, фасоль и коровий горох *Vigna sinensis*. ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ТТИ – 60–65 °С, ПСИ – 4 сут. Эти результаты близки к данным, имеющимся в литературе: ТТИ – от 60 до 65 °С, но может колебаться в пределах 50–76 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 1–4 сут (Brunt et al., 1996). Вирус передавался тлями неперсистентно (Поливанова и др., 1977). Для получения иммуногена к дальневосточному картофельному изоляту ВМЛ для размножения и накопления вируса использовали растения табака клейкого *N. glutinosa*. После инокуляции листья снимали на 12–15-й день, в момент максимального накопления вируса. Ас была специфична и реагировала не только с дальневосточным картофельным изолятом ВМЛ, но взаимодействовала и с европейским изолятом вируса. Причем Ас была строго специфична, так как не реагировала ни с одним из вирусов, встречающихся на ДВР на бобовых культурах (ВМС, ВЖМФ, ВКПТ, ВЗРС). Это давало основание считать, что вирус относится к роду *Alfavirus*, так как он не имел антигенного родства с вирусами других родов.

### Род *Bromovirus*

Список видов рода *Bromovirus* включает около 10 представителей. Типовой вид рода – вирус мозаики костра *Brome mosaic virus*. Вирусы этого рода – полиэдрические частицы диаметром 26 нм. При рН ниже 6,0 они имеют  $S_{20,w}$  88 S, стабильны при высокой концентрации солей и при низкой – детергентов, нуклеазо- и протеазоустойчивы. При рН 7,0 и выше вирионы разбухают до 31 нм, имеют  $S_{20,w}$  78 S, теряют стабильность в растворах солей и детергентов и устойчивость к ферментам, изменяют конформацию капсида. Инкапсидированы четыре молекулы линейной положительно-геномной онРНК: РНК 1 содержит 3234 нт., РНК 2 – 2865 нт., РНК 3 – 2114 нт. и РНК 4 – 876 нт. 3'-концы РНК имеют тРНК-подобную структуру и могут аминоацилироваться тирозином. Один полипептид белка оболочки имеет м.м. 20 кДа. Плавучая плотность в CsCl – 1,35 г/см<sup>3</sup>. У разных видов бромовирусов выявлено сходство в аминокислотном составе белка оболочки; менее выраженное сходство отмечено при сравнении с кукумовирусами.

*Липиды и углеводы* не обнаружены.

Все вирусы рода *Bromovirus* имеют антигенное родство.

Бромовирусы собираются в цитоплазме, где проявляются в виде зернистых включений. Иногда наблюдаются кристаллические массы вирусных частиц. Частицы могут находиться в цитоплазме и в ядрах ранее инфицированных клеток. Круг растений-хозяев узкий. Возможно, передаются жуками (вирус мозаики костра с трудом передается неперсистентно), легко передаются механической инокуляцией сока.

Вирус мозаики костра *Brome mosaic virus*

Впервые вирус мозаики костра (ВМК) описан в США (McKinney, 1944). ВМК встречается на всех континентах и довольно широко распространен в США, Канаде, Германии, бывших странах Югославии, Финляндии, Турции, АРЕ, Узбекистане, Украине, Беларуси и Молдове. В России этот вирус впервые обнаружен в Воронежской области (Власов и др., 1964). С тех пор он был зарегистрирован во всех зерносеющих регионах России: Воронежская, Саратовская области, Северный Кавказ, Сибирь и Дальний Восток. В некоторые годы являлся достаточно вредоносным на юге России, например в Краснодарском крае. В конце прошлого века ВМК обнаружили в Нечерноземной зоне, в Поволжье, на Кубани (Забавина, 1991; Цыпленков, Власов, 1993).

**Свойства вирионов.** Сферические вирионы ВМК диаметром 26 нм состоят из однонитевой линейной РНК и белка оболочки. Инфекционностью обладают только высокомолекулярные РНК. Белок оболочки ВМК икосаздрической симметрии, состоит из 180 идентичных субъединиц м.м. 20 кДа (Lane, 1979).

**Биологические свойства.** Вирус поражает 162 вида растений из 7 семейств. Среди злаковых культур ВМК выделен из костра безостого, озимой пшеницы, озимого ячменя, кукурузы, сорго, мятлика лугового и других дикорастущих злаков. Вирус часто встречается в смешанной инфекции с вирусом полосатой мозаики пшеницы на пшенице и вирусом карликовой мозаики кукурузы на сорго и кукурузе. Пролиферации почек и розеточности не наблюдается.

Естественными растениями-хозяевами являются только злаки. Но восприимчивыми к нему могут быть и двудольные растения многих видов из нескольких семейств. На Дальнем Востоке вирус мозаики костра обнаружен в 1973–1975 гг. в Приморском крае и Амурской области на культурных и дикорастущих злаках. Обследовались на присутствие вируса производственные и опытные посевы пшеницы, ячменя, овса, ржи, кукурузы, тимофеевки луговой, костра безостого, пырея ползучего, а также дикорастущие злаки. Изоляты ВМК были выделены из пшеницы, ячменя, овса, тимофеевки луговой, проса пастушьего, пырея ползучего и вейника коротковолосистого. Большая часть изолятов ВМК поражала пырей ползучий, очаги которого находили вокруг посевов ранних зерновых. Растения были поражены яркой желто-зеленой и желтой мозаикой. Установлено, что зараженность посевов зерновых ВМК обычно не превышала 1 % (Соколова и др., 1977). По данным этих авторов, круг растений-хозяев для дальневосточного изолята ВМК был довольно широк и включал кроме костра безостого *Bromus inermis* Leuss. пшеницу *Triticum aestivum* L., ячмень *Hordeum vulgare* L., рожь *Secale coreale* L., овес *Avena sativa* L. var *Orientalis* Sch., сорго *Sorghum vulgare* Pers. и еще около 50 видов дикорастущих злаков. Обычно на листьях пораженных растений наблюдали светло-зеленые, желтые, белые или некротические штрихи и полосы, а также крапчатость, варьирующуюся от светло-зеленой до ярко-желтой мозаики. Листья больного порея ползучего имели четкие крупные штрихи и полосы параллельно главной жилки листа. ВМК – природно-очаговое заболевание. Площадь очагов пораженных растений могла варьироваться от 0,25 до 25 м<sup>2</sup>.



**Передача.** ВМК – уникальный вирус, превосходящий по числу зарегистрированных переносчиков все другие вирусы растений. Он может передаваться нематодами *Longidorus* и *Xiphinema*, некоторыми видами жуков рода *Diabrotica*, пьявицей, хлебной полосатой блошкой, злаковыми тлями, клещами и другими переносчиками. За рубежом получены данные о распространении ВМК уредоспорами стеблевой ржавчины пшеницы (Власов, Самсонова, 2005). Помимо всего ВМК – контактный вирус и может передаваться при контакте растений, что особенно характерно при загущенных посевах. Вирус хорошо передается механической инокуляцией, но не семенами. Сохраняется инфекция преимущественно в дикорастущих многолетних злаках.

По различным литературным данным, ТТИ в соке составляет от 50–65 °С и 78–80 °С (в зависимости от изолята), ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – от 28 дней до 10 мес. (Murayama, 1998; Можяева, 2003). Дальневосточные изоляты ВМК имели ТТИ – 70–75 °С (изолят из овса), 75–80 °С (изолят из ячменя). ПРС колебалось от  $10^{-3}$  до  $10^{-6}$  (в зависимости от изолята). ПСИ также колебалась и зависела от изучаемого изолята. Так, изоляты из овса, тимофеевки, пастушьего проса, вейника и пырея сохраняли инфекционность в течение 16 сут, а из пшеницы, ячменя и пырея – 32–34 сут (Соколова и др., 1977).

Вирусные частицы дальневосточного изолята ВМК имели сферическую форму, модалный диаметр 26 нм (Соколова и др., 1977).

**Физико-химические свойства.** ВМК накапливали в растениях ячменя сортов Винер и Приморский-99 для изучения физико-химических и антигенных свойств. За основу методики получения очищенного вирусного препарата нами был взят метод, предложенный Р. Хиллом (Hull, 1972), с нашими небольшими модификациями. На 12–15-й день после инокуляции листья растений ячменя гомогенизировали в 0,2 М ацетатном буфере (ацетат натрия), рН 5,0, с добавлением 0,1 % аскорбиновой кислоты и 0,1 % 2-меркаптоэтанола. В гомогенат для осветления приливали 1/5–1/7 часть хлороформа и гомогенизировали не более 2 мин. Вирус из осветленного гомогената осаждали 7 %-ным ПЭГ с добавлением 0,3 М NaCl. После выстаивания смеси в течение 1 ч осадок отделяли центрифугированием при 6000 g в течение 20 мин. Вирус ресуспендировали в 0,5 М ацетатном буфере, рН 5,0. Дальнейшую очистку проводили 2-кратным дифференциальным центрифугированием (70–90000g 100 мин и 15–18000g 20 мин). Электрофорез белков очищенного вирусного препарата показал наличие одной белковой зоны. Вирус седиментировал одним пиком при аналитическом центрифугировании и имел коэффициент седиментации 86–88 S в ацетатном буфере с рН 5,0. М.м. КБ дальневосточного изолята ВМК – 20 кДа, что согласуется с данными литературы (Lane, 1979).

Препарат вируса имел типичный спектр поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 240–245 нм и минимумом при 255–260 нм. Соотношение величин оптических плотностей при 260 и 280 нм ( $A_{260/280}$ ) и спектра поглощения, скорректированного с учетом светорассеивания, равно 1,60/1,65. Коэффициент экстинкции  $E_{260}^{0,1\%}$  для вируса = 5,1.

Выход вируса был 15–30 мг на 100 г свежесорванных листьев.

**Антигенные свойства.** Первая попытка получения антисыворотки к ВМК была предпринята нами к изоляту, идентифицированному из растений пырея ползучего (Соколова и др., 1977). Вирус накапливали в растениях ячменя сорта Винер. За цикл иммунизаций по упрощенной схеме, включавшей 5 внутривенных инъекций, ввели кроликам 1,4 мг очищенного препарата вируса.

Для другого изолята ВМК, идентифицированного из растений серобородника, была отработана схема иммунизации, позволяющая получить антисыворотку с высоким титром специфических антител: 1-й день – 500 мкг иммуногена в/к в 10–15 точек вдоль позвоночника и по боковым линиям тела животного в места расположения лимфоузлов с адьювантом Фрейнда. Неспецифическую стимуляцию иммунного ответа дополнительно проводили в/м введением 0,25 мл АКДС. 8-й день – 1 мг иммуногена в/к в 10–15 точек вдоль позвоночника по боковым линиям, в уголки лопаток и п/к в подколенные ямки; 23-й день – 1 мг вируса в/в. Через 130 дней после последней инъекции животные были реиммунизированы комбинированным способом (по 500 мкг иммуногена в/в и в/к).

Приготовленная антисыворотка к изоляту ВМК из пырея была активна и строго специфична, четко реагировала с ВМК как в КА, так и в РДД, а вирусный изолят ВМК был активным иммуногеном. Титр Ас к изоляту ВМК из серобородника в РДД соответствовал – 1:2048. В результате реиммунизации через 4,5 мес. удалось повысить титр с 1:32 до прежнего уровня.

Радиальную иммунодиффузию (РИД) применяли для определения концентрации ВМК в соке зараженных растений. Расплавленный агар смешивали с экспериментально подобранной аликвотой антисыворотки (5 %) при 50 °С. На предметное стекло наносили 4,0–4,5 мл полученной смеси, а в лунки вносили по 10 мкг Аг (вирусный препарат) или сок зараженных растений соответствующих разведений. Концентрацию вируса в препарате определяли по диаметру колец (преципитата), образующихся в результате иммунохимической реакции, используя калибровочные прямые контрольных антигенов с известной концентрацией. С помощью РИД была определена концентрация ВМК – 1,2 мг/мл в соке из листьев растений ячменя сорта Винер, что позволило проследить динамику накопления вируса в растении во время его вегетации.

Непрямой вариант ИФА использовали для детекции ВМК в соке зараженных растений (Сибирякова и др., 1987; Koenig, 1981). Препараты гомологичного (ВМК) и гетерологичного (ВТМ) антигенов титровали в диапазоне 5 нг–200 мкг/мл, разведение инфекционного сока и сока здоровых растений было 1:50. Рабочее разведение Ас и антивидового конъюгата (IgG осла против IgG кролика) составило 1:100–1:200. Ас ВМК реагировала с гомологичным вирусом и двумя дальневосточными штаммами бромовирусов, идентифицированными из горошка однопарного (Волков и др., 1989). Ас против ВМК, полученная нами из Германии, реагировала с дальневосточными изолятами ВМК в РДД. Высокая чувствительность непрямого метода ИФА позволила



выявить до 10 нг вируса в очищенных препаратах и в соке растений, разведенном до  $10^{-5}$ . Этим методом была определена концентрация ВМК в соке листьев растений ячменя сорта Приморский-99, которая соответствовала 0,6–0,8 мг/мл.

Итак, в Дальневосточном регионе России идентифицирован типовой вид рода *Bromovirus* – вирус мозаики костра.

### Вирус мозаики горошка однопарного *Vicia unijuga mosaic virus*

На дикорастущих растениях горошка однопарного *Vicia unijuga* A. Br. из семейства бобовых в Приморском крае идентифицировано 3 изолята вируса мозаики горошка однопарного (ВМГО): некротический – ВМГОн, мозаичный – ВМГОм и пятнистый – ВМГОп (Волков, Костин, 1988), названные по проявлению симптомов на растениях горошка в естественных условиях. Изоляты пассировали через некроз на горохе сорта Аляска и поддерживали на бобах конских сорта Русские черные.

**Биологические свойства.** Для вируса характерен ограниченный круг растений-хозяев (преимущественно бобовых). Он включал 5 выявленных в природе и 34 искусственно зараженных растений и небольшой очаг заболевания (Волков, Костин (1988). Отмечена легкость механической передачи вируса и отсутствие передачи семенами бобов, гороха, вигны, фасоли. Не установлена передача вируса тлями (использовали в эксперименте 4 вида). На горошке однопарном – природном носителе вируса – в зависимости от штамма наблюдали яркую желтую пятнистость на листьях одних растений и некротизацию жилок и участков – на листьях других, но на большинстве проявлялась обычная мягкая желтая диффузная мозаика (Волков и др., 1989).

**Физико-химические свойства.** Частицы вируса икосаэдрической формы, диаметром  $27 + 0,5$  нм, содержат 22–24 % РНК и представлены двумя популяциями вирионов с плавучими плотностями  $1,356 + 0,02$  г/см<sup>3</sup> (легкие частицы) и  $1,368 + 0,02$  г/см<sup>3</sup> (тяжелые частицы). Константа седиментации вируса при pH 5,0 составила 85–87 S, а при pH 7,0 – 76–79 S. Изоэлектрическая точка вируса – pH 7,2. ТТИ – 69–72 °С, ПРС  $-10^{-3}$ – $10^{-4}$ . Препараты вируса характеризовались следующими спектральными свойствами:  $A_{260/280}$  – 1,76–1,78;  $A_{\max/\min}$  – 1,35; коэффициент экстинкции (абсорбции) –  $5,4 + 0,5$  оптических единиц (о.е.). Максимум поглощения приходится на 262 нм, минимум – на 242 нм (Волков и др., 1989).

В очищенных препаратах вируса выявлено 4 РНК с м.м. 1,12; 1,03; 0,83; 0,32 мДа и белок м.м. 20 кДа. По совокупности изученных физико-химических и биологических свойств Ю.Г. Волков (1989) отнес исследуемый вирус к роду бромовирусов, несмотря на отличия от известных вирусов этого рода по изоэлектрической точке, плавучей плотности и по другим характеристикам, и назвал его вирусом мозаики горошка однопарного (табл. 18).

Сравнительная характеристика свойств бромовирусов (по: Ю.Г. Волков, 1989)

Свойства вирусов*	ВМК	ВКБО**	ВХКВ***	ВМГО
Диаметр вирионов, нм	26	26	25	27
Изоэлектрическая точка, рН	7,9	5,6	3,6	7,2
Плавучая плотность, г/см <sup>3</sup> :				
легкие частицы	1,348	1,355	1,356	1,356
тяжелые частицы	1,355	1,363	1,360; 1,364	1,368
Константа седиментации:				
рН 5,0	87	85	88	85-87
рН 7,0	79	-	78	73-76
A <sub>260/280</sub>	1,7-1,76	1,72-1,76	1,64-1,72	1,76-1,78
A <sub>max/min</sub>	1,45-1,49	1,55	1,45	1,36
Коэффициент экстинкции, о.е.	5,08-6,7	4,84-5,4	5,87	5,4+0,3
М.м., мДа:				
РНК 1	1,10	1,10	1,20	1,12
РНК 2	0,97	1,03	1,07	1,03
РНК 3	0,72	0,90	0,81	0,83
РНК 4	0,30	0,36	0,28	0,32
Белок, кДа	20×10 <sup>3</sup>	20,5×10 <sup>3</sup>	19,6×10 <sup>3</sup>	(20+0,5)×10 <sup>3</sup>

\*Данные приводятся по Л. Лэйну (Lane, 1977; 1981), Франки (Franki, 1985), Саймонсу (Symons, 1985). \*\*ВКБО – вирус крапчатости бобов обыкновенных. \*\*\*ВХКВ – вирус хлоротической крапчатости вигны.

**Антигенные свойства.** Мы попытались подтвердить правильность отнесения впервые выявленного вируса к роду бромовирусов с помощью исследования антигенных свойств капсидных белков его штаммов. Антивирусные сыворотки к трем изолятам вируса были получены по той же схеме, что и для ВМК. Доза вируса за весь цикл иммунизации не превышала 2,5 мг. Максимальный титр специфических антител, определенный в РДД, составил для ВМГОн – 1:512, ВМГОм – 1:128, ВМГОп – 1:32. Идентичные антигенные детерминанты у трех изолятов ВМГО и ВМК были выявлены РДД. Антигенные различия между изолятами ВМГО определялись по титрам антисывороток в перекрестных реакциях с изолятами ВМГО. В качестве антигена использовались очищенные препараты изолятов ВМГО и сок из листьев растений бобов *F. bona Medic.*, cv. Handown и сорт Русские черные, зараженных изолятами ВМГО. Сок бобов окрашивал агар, вызывал почернение геля вокруг лунок (вероятно, это связано с окислением танинов), поэтому в него добавляли непосредственно перед постановкой РДД 0,01 %-ный 2-меркаптоэтанол или 0,01 %-ную тиогликолевую кислоту. В качестве контроля использовали антисыворотки, полученные нами и к сферическим вирусам других родов, таких как кукумовирус огуречной мозаики, некривирус некроза табака, комовирусы – крапчатости красного клевера и мозаики редиса. Ни одна из



этих антисывороток не реагировала с изолятами ВМГО и ВМК, в то время как между изолятами ВМГО было выявлено близкое антигенное родство. В РИЭФ показано наличие идентичных эпитопов капсидных белков у ВМГОм, ВМГОн и ВМК. Однако изолят ВМГОп не реагировал с антисывороткой против ВМК (специфического пика в виде ракеты не наблюдали). Эти результаты подтвердили данные непрямого варианта ИФА.

Итак, данные по изучению морфологии вирионов, биологических, физико-химических и антигенных свойств КБ трех изолятов ВМГО и результаты сравнительной характеристики с типовым видом рода *Bromovirus* вирусом мозаики костра дали основание считать, что вирус мозаики горошка однопарного *Vicia unijuga mosaic virus* является новым для ДВ России видом рода *Bromovirus* семейства *Bromoviridae*. Первоначально его называли вирусом мозаики вики однопарной, но с уточнением вида растения, из которого он был идентифицирован, он приобрел окончательное название – вирус мозаики горошка однопарного (Костин, 2005).

### Род *Cucumovirus*

Род кукумовирусов включает всего три вида: вирус огуречной мозаики (ВОМ) *Cucumber mosaic virus*, вирус карликовости земляного ореха *Peanut stunt virus* и вирус аспермии томатов (ВАТ) *Tomato aspermy virus*. В 1998 году этот род был отнесен к семейству *Bromoviridae* (Mayo, Pringle, 1998). Возможно, вирус кольцевой пятнистости коровьего гороха и вирус задержки роста сои также входят в состав этого рода. Вирус карликовости земляного ореха описан в США, Японии и Европе (Kaper, Waterworth, 1977). В бывшем СССР этот вирус был обнаружен на Украине (Краев и др., 1977). На ДВ России выявлены три кукумовируса – ВОМ, ВАТ и вирус задержки роста сои (Поливанова, 1974; Чуян, Крылов, 1979; Гнутова, Толкач, 2004).

**Свойства вирионов.** Для вирусов, принадлежащих к данному роду, характерны сферическая форма вириона, диаметр около 28–33 нм. Вирусы лабильны и чувствительны к нейтральным солям и анионным детергентам, легко разрушаются в присутствии нейтральных солей хлоридов и ДСН. Белок оболочки 24 кДа, коэффициент седиментации  $S_{20,w} - 99 S$ ; плавучая плотность в CsCl – 1,37 г/см<sup>3</sup> частицы. Оболочка вириона образована субъединицами одного полипептида.

**Нуклеиновая кислота.** Сегментированный геном кукумовирусов состоит из четырех молекул (+)РНК: РНК 1 содержит 3410 нт., РНК 2 – 3035 нт., РНК 3 – 2193 нт. и РНК 4 – 1027 нт.; 3'-концы РНК имеют тРНК-подобную структуру, способную аминоацилировать тирозином.

С вирусами рода часто связаны сателлитные РНК (CARNAS и PARNAS) длиной 330–390 нт. CARNAS и PARNAS, зависимые от генома кукумовирусов в инкапсидировании и репликации, способствуют более четкому проявлению симптомов у растения.

**Антигенные свойства.** Кукумовирусы имеют между собой антигенное родство. Иммуногенная активность капсидных белков зависит от штамма вируса. Различаются

они и по стабильности вирионов. ВОМ легко разрушается в нейтральных хлоридных солях, является слабым иммуногеном (за исключением отдельных изолятов), что значительно затрудняет получение и хранение очищенных препаратов и активной антисыворотки. Выход ВАТ на 1 кг зараженного материала в 1,5–2 раза выше, чем ВОМ. ВАТ характеризуется как более сильный иммуноген, что позволяет сравнительно легко получать Ас с высоким титром. Однако некоторые авторы считают, что ВАТ мало отличается от ВОМ по иммуногенным свойствам (Habibi, Francki, 1975). ВОМ имеет большое внутривидовое разнообразие. Для некоторых изолятов ВОМ характерно частичное антигенное родство или они близкородственны, другие такой связи не имеют (Habibi, Francki, 1975; Rao et al., 1982).

**Биологические свойства.** Между видами рода существуют различия по кругу растений-хозяев. ВОМ заражает растения, по крайней мере, из 57 семейств (Kareg, Waterworth, 1977), в то время как ВАТ встречается в основном на хризантемах и томатах, хотя по экспериментальным данным он заражает растения около 30 семейств (Holligs, Stone, 1970).

**Передача.** Распространяются кукумовирусы непersistентным способом многими видами тлей. Передача кукумовирусов тлей *M. persicae* определяется исключительно белком вирусной оболочки (Chen, Francki, 1990). Вирусы легко передаются механической инокуляцией сока. Отмечена передача семенами для нескольких растений-хозяев.

В клетке вирусные частицы собираются и рассеяно накапливаются в цитоплазме; иногда они присутствуют также в ядре и вакуолях, образуя кристаллы.

ТТИ – 60–75 °С; ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ ; ПСИ – 2–5 сут.

Представители данного рода ВОМ и ВАТ наносят большой ущерб экономически важным в растениеводстве овощным и декоративным культурам и, за исключением вируса карликовости земляного ореха, имеют широкий круг растений-хозяев.

Более подробно остановимся на описании ВОМ – типовом виде рода, который широко распространен на многих растениях различных семейств и поражает многие сельскохозяйственные культуры, возделываемые на Дальнем Востоке России. При этом более всего страдают от вирусной инфекции овощные и декоративные культуры.

### Вирус огуречной мозаики *Cucumber mosaic virus*

Впервые заболевание на растениях огурцов, вызываемое ВОМ, было описано Selby в 1903 г. в США, но более детально вирус был изучен другим американским исследователем (Doolittle, 1916).

**Свойства вирионов.** Диаметр частиц ВОМ в среднем составляет 29 нм. Оболочка вируса состоит из 32 морфологических субъединиц КБ, расположенных в узлах икосаэдрической решетки (Метьюз, 1973). М.м. белка оболочки составляет  $24,2 \pm 0,6$  кДа (Hill, Shepard, 1972).

**Геном** вируса состоит из трех молекул однонитчатой (+)РНК, обозначенных РНК 1, РНК 2, РНК 3 в порядке уменьшения их м.м. – 1,35; 1,16; 0,85 мДа соответ-



ственно (Peden, Symons, 1973). Кроме того, в вирионах также содержится субгеномная РНК 4, имеющая м.м. 0,35 мДа. Она не является необходимой для сохранения инфекционности вируса, поскольку представляет собой 3'-конец РНК 3 и служит матрицей для синтеза оболочечного белка вируса (Schwinghamer, Symons, 1975). Суммарная емкость генома кукумовирусов составляет 5 генов.

РНК 1 и РНК 2 кодируют белки 1а и 2а, включенные в репликацию вируса (Nitt et al., 1988; Rezaian et al., 1985; Hayes, Buck, 1990). Эти белки имеют м.м. 95 и 11 кДа соответственно. Белок 1а – компонент вирусной репликазы, содержащий домены хеликазы и метилтрансферазы (Gal-On et al., 1994). Белок 2а выполняет функцию РНК-полимеразы (Hellwald, Palucaitis, 1995).

Компьютерный анализ нуклеотидной последовательности РНК 2 штамма ВОМ-Q показал, что она имеет высокую степень гомологии с РНК 2 вируса мозаики костра и вирусом мозаики люцерны, а также с регионом РНК ВТМ, кодирующим часть 183 кДа белка (Rezaian et al., 1984). Это является отражением филогенетического родства вирусов разных родов в пределах одного семейства.

В отличие от других видов семейства *Bromoviridae*, РНК двух членов рода *Stictovirus* также содержит второй ген, кодирующий белок 26, экспрессируемый с субгеномной РНК 4А (Ding et al., 1994). Продукт данного гена вовлечен в дальний транспорт вируса, что позволило сделать предположение о его роли в качестве фактора, определяющего широту круга растений-хозяев.

По данным трансляции *in vitro*, РНК 3 кодирует 2 продукта – 3'-терминальный белок оболочки и 5'-терминальный ЗА-белок (Schwinghamer, Symons, 1977). Последний ответствен за движение вируса из клетки в клетку (Kaplan et al., 1997). Транспортную функцию также выполняет и капсидный белок ВОМ (Kaplan et al., 1998; Canto et al., 1997). Геномные РНК ВОМ помимо основных функций имеют и дополнительные. В частности, их продукты содержат детерминанты, определяющие характер и суровость симптомов заболевания у пораженных растений (Zhang et al., 1994).

Характерной особенностью ВОМ является наличие сателлитных РНК (сат-РНК). Они, как правило, имеют небольшие размеры (334–342 нт.) и инкапсидированы в вирионах вместе с геномной РНК. Сат-РНК обнаружены у некоторых изолятов ВОМ из США (Kaper, Tousignant, 1977), Австралии (Gould et al., 1978), Японии (Takanami, 1981) и штаммов, встречающихся в других регионах мира. Обычно содержание сат-РНК в вирионах составляет 2–5 % массы всей инкапсидированной РНК. В некоторых видах растений-хозяев уровень сат-РНК может достигать 50 % от всей вирусной РНК (Palukaitis, Zaitlin, 1984). Сат-РНК имеют невысокую степень гомологии с геномной РНК, но нуждаются в ней для своей репликации.

Белок оболочки ВОМ состоит из 218 аминокислот. Аминокислотная последовательность, являясь производной от нуклеотидной последовательности РНК 3 генома, неодинакова у разных штаммов. Применение пептидного картирования дало возможность сравнить белок оболочки штаммов ВОМ и разделить их на две группы, соответствующие S- и WT-группам (Edwards, Gonsalves, 1983).

**Видовое разнообразие.** В природе ВОМ существует в виде многочисленных штаммов, образующихся в результате мутаций генетического материала вируса.

Описано более 60 штаммов вируса (цит. по: Hayakawa et al., 1989 a). Наиболее изучены австралийский штамм из растения перца – BOM-Q (Francki et al., 1966; Kaper, Re, 1974); штаммы из томата (BOM-D) и колокольчика азиатского *Ranunculus asiaticus* (BOM-R) во Франции (Lot, Kaper, 1976; Devergne, Cardin, 1973); южно-африканский штамм из тыквы – BOM-S (Van Regenmortel, 1961; Van Regenmortel et al., 1972) и многие другие. К настоящему времени определена нуклеотидная последовательность всех трех молекул РНК штамма BOM-Q. Кроме того, для некоторых штаммов (BOM-Fny, -C, -WL, -M и других) определена нуклеотидная последовательность отдельных компонентов генома с целью сравнения и изучения филогенетических отношений (Hayakawa et al., 1989 в; Quemada et al., 1989; Rizzo, Palukaitis et al., 1989).

Пиазолла с соавт. (Piazolla et al., 1979) провели исследование гомологии вирусной нуклеиновой кислоты 18 штаммов BOM методом конкурентной РНК-РНК гибридизации. Результаты позволили авторам разделить исследуемые штаммы на S- и WT-группы. Внутри каждой из них степень гомологии РНК между штаммами оказалась очень велика (92–98 %). Между штаммами, отнесенными к разным группам, степень гомологии, как правило, составляла 10–50 %. Подводя итог своей работе, авторы делают вывод, что популяция BOM является генетически неоднородной. Вместе с тем одни штаммы более тесно связаны и близки, нежели другие, благодаря чему их можно отнести к одной из двух групп. Однако некоторые штаммы имеют уникальные последовательности, что не позволяет определить их групповую принадлежность.

К началу 90-х гг. XX века уже на основе обнаруженных различий в последовательности их генома штаммы BOM разделили также на две основные группы (Rizos, 1997; Lin et al., 2003), но около 40 штаммов вируса не вошли ни в одну из двух групп.

**Биологические свойства.** Поскольку круг растений-хозяев и их ответная реакция на инфекцию являются результатом работы вирусного генома и его взаимодействия с растением, биологический критерий все же остается очень важным в идентификации штаммов BOM и широко используется. Биологическое тестирование изолятов BOM, содержащих sat-РНК, позволило разделить их по способности индуцировать летальный некроз томатов на 2 группы – некротические и не некротические (Kaper et al., 1988). Нуклеотидные последовательности, ответственные за некротический тип проявления инфекции, локализованы вблизи 3'-конца молекулы sat-РНК (Sleat, Palukaitis, 1990; Devic et al., 1990; Gusui et al., 1993). Марроу с соавт. (Marrou et al., 1975) на основе реакций табака сорта Xanthi штаммы BOM разделили на две группы. К первой отнесли штаммы -Q, -S, -R, -To, вызывающие при заражении локальные и системные гравированные кольца, светлую крапчатость. Ко второй – штаммы D, -G, -T1, -Tn, которые индуцировали хлоротичные повреждения или лагентную инфекцию на инокулированных листьях, а также системную мозаику, пятнистость и деформацию.

Другие исследователи, изучая 18 штаммов BOM (Wahyuni et al., 1992), также разделили их на две группы. Штаммы различались по реакции на растениях *N. edwardsonii*, *N. tabacum* cv. Xanthi и *Capsicum frutescens*. Кроме того, они обратили внимание на то, что по антигенным и биологическим свойствам эти штаммы также



разделяются на две группы. Вместе с тем отнесение некоторых штаммов к какой-либо из этих двух групп оказалось затруднительным.

Круг растений-хозяев, поражаемых ВОМ, довольно широк. Прайс (Price, 1940) в качестве чувствительных к вирусу растений назвал около 300 видов из 64 семейств, позже Дж. Хорват (Horvath, 1979 a), обобщая результаты своих многолетних экспериментальных данных, показал, что круг естественных хозяев состоит из 476 видов, относящихся к 67 семействам, а экспериментальный круг растений включал еще 536 видов и разновидностей из 53 семейств. Суммарное число растений-хозяев ВОМ – 1012 видов – составляет самый широкий круг тест-растений из всех известных в настоящее время. В то же время устойчивы к инфекции ВОМ растения 402 видов из 71 семейства.

ВОМ встречается на всех континентах и является широко распространенным и вредоносным вирусом для многих важнейших в экономическом отношении культурных растений. Вирус заражает томаты, перец, сельдерей, морковь, укроп, петрушку, салат, шпинат, лук, капусту, картофель, некоторые бобовые (горох, фасоль, люпин, коровий горох), а также кукурузу, табак, махорку, сахарную свеклу, плодовые и ягодные культуры, виноград, гранат, цитрусовые, множество растений сорной и дикой флоры. ВОМ наносит ущерб экономически важным тыквенным, овощным, бахчевым культурам, табаку, многочисленным цветочным культурам (Билай и др., 1988). В бывшем СССР впервые заболевание огурцов с симптомами мозаичности листьев описано Вовком в 1941 году (цит. по: А.В. Крылов, 1983). Вирус позже был выявлен в Латвии (Петерсон, Игнаш, 1970), Литве (Шимкунас, 1970), Молдавии (Дашкеева, Варгина, 1977), Казахстане (Алманиязов, 1974) и др. На территории России ВОМ распространен повсеместно и особенно вредоносен на пасленовых, тыквенных и бобовых культурах, а также зарегистрирован на ряде плодовых, ягодных, декоративных культур и многих видах сорных растений (Цыппленков, 2008). Зоны повышенной вредоносности ВОМ и частое возникновение эпифитотийных ситуаций отмечены на Северном Кавказе и в Закавказье, Белоруссии, в бывших республиках Средней Азии.

Из овощных культур ВОМ наиболее часто поражает перцы, томаты и огурцы по сравнению с другими вирусами растений. Например, на северо-востоке Италии поражение перцев достигало 80 % (Conti, Mosenga, 1977), а в тепличных хозяйствах Хабаровского края в 1979–1980 гг. зараженность томатов ВОМ составила 90 % (Власов и др., 1986).

В связи с исключительной экономической важностью такой овощной культуры, как огурцы, изучению ВОМ в бывшем СССР уделялось большое внимание (Власов и др., 1986; Петерсон, Игнаш, 1970; Шимкунас, 1970; Иорданова, 1979). Описано более 20 различных симптомов поражения этим вирусом огурцов (рис. 21), проявляющихся на листьях, цветках, стеблях и плодах (Дашкеева, Варгина, 1977). На молодых листьях наблюдали небольшие кольца, затем развивалась типичная мозаика. У больных растений укорачивались междоузлия, рост замедлялся. В некоторых случаях вирус вызывал увядание растений. Плоды были мозаичные, темно-зеленые, с выпуклыми участками, что создавало впечатление бородавчатости. На посадках, где был отмечен



Рис. 21. Различные симптомы проявления вируса огуречной мозаики на огурцах

ВОМ, получали не более 25 % возможного урожая огурцов. Плоды, как правило, были мелкие, уродливые, с симптомами мозаики.

Наиболее характерными признаками поражения перца ВОМ являлись измельчение и деформация листьев, хлоротичная крапчатость, некротические штрихи, дуги и колечки, а также карликовость. На плодах иногда отмечали появление желтых или некротических пятен (Moogman, Woodbridge, 1983; Чернявская, 2003). В Калифорнии (США) на перце были обнаружены штаммы ВОМ, различающиеся по патогенности (Paulus et al., 1962). Слабые штаммы продуцировали на растениях перца желто-зеленую крапчатость, а суровые на некоторых сортах вызывали некроз стеблей. Были изучены три штамма ВОМ, поражающие перцы во Флориде (Simons, 1957), которые отличались по симптомам на тест-растениях.

На томатах после заражения ВОМ на 10-е сутки наблюдали удлинение молодых листьев, которые винтообразно скручивались и загибались вниз. На старых листьях



отмечен хлороз, особенно вдоль жилок, через 21 сутки после инокуляции появлялись нитевидные листья (папоротниковидность листьев), наблюдали карликовость растений. Для пораженных растений характерно было образование множества боковых листиков (Цыпленков, 1984). Известно также некротическое заболевание томата, вызванное вирусом (Montasser et al., 1991). Впервые оно под названием «летальный некроз томатов» было описано во Франции (Kaper, Waterworth, 1977), где в 1972 году вызвало полную потерю урожая этой культуры. Позднее было установлено, что причиной заболевания являлась сателлитная РНК CARNAS BOM (Waterworth et al., 1978). Изучение CARNAS и других сат-РНК BOM показало, что они вызывают летальный некроз томатов в том случае, если их содержание в растении достигает определенного порога (Kaper, Tousignant, 1977). При некротическом типе проявления симптомов на томатах снижение урожая от BOM может достигать 100 %, а при мозаичном – от 68 до 95 %.

Другой тип поражения BOM томатов описан (Gonsalves et al., 1982) в штате Нью-Йорк (США). На листьях зараженных растений наблюдали бело-зеленую крапчатость. Незрелые плоды имели белую окраску. Был выделен штамм BOM, получивший название BOM-WL (white leaf – белые листья), и установлено, что за такие яркие симптомы отвечает сат-РНК. В некоторых случаях причиной необычного типа поражения томатов является не сат-РНК, а геномная РНК вируса. Так, в Китае (Kearney, 1990) был обнаружен штамм BOM, вызывающий пурпурную окраску, закрученность листьев, кустистость и карликовость растений. Столь суровые симптомы индуцировались именно геномной РНК вируса. Таким образом, согласно литературным данным, типы поражения томатов BOM зависят от штамма вируса и определяются его геномной и сателлитной РНК.

На листьях дыни, тыквы, патиссона при поражении BOM развивались яркие симптомы крапчатой мозаики с темными пузыревидными вздутиями. На плодах отмечены признаки бородавчатости. Хорват с соавт. (Horvath et al., 1975 a) выделил BOM из растения патиссона с симптомами сильной деформации листьев.

О поражении BOM баклажанов имеется мало сведений. Известно лишь, что данная культура заражалась этим вирусом в Калифорнии (Yilma et al., 1984). Вирус на баклажане обнаружен и на ДВ России (Толкач и др., 2002).

Мониторинг фитовирусов, проведенный нами в 2001–2007 гг. на посадках овощных культур, показал, что BOM в Приморском крае поражал томаты, огурцы, перцы, реже арбузы, кабачки, патиссоны, баклажаны, тыкву, а в Хабаровском крае чаще всего – тыкву, томаты, перцы и дыни. Не отмечено инфекции BOM на капусте, хрене, салате и петрушке (Толкач, Гнутова, 2003; Гнутова, Толкач, 2008).

Что касается эпидемиологии BOM, то вирусные эпифитотии имеют природно-очаговый характер. Вирус резервируется в многолетних дикорастущих и сорных растениях (Власов, 1992). Исследования, посвященные выявлению растений дикой флоры как источника BOM для растений культурной флоры, неоднократно проводились в разных странах (Feldman, Gracia, 1972; Bruckart, Lorbeer, 1976; Horvath, 1983; Rist, Lorbeer, 1986). Многими исследователями показано, что довольно большое число сор-

ных растений являются резервуарами вируса. Декоративные растения также нередко служат источником инфекции ВОМ для большинства с/х культур. ВОМ принадлежит к типичным природоочаговым вирусам, когда возбудитель вирусного заболевания, его переносчик и растения-резервуары инфекции в течение смены своих поколений неограниченно долгое время могут существовать вне зависимости от сельскохозяйственных культур. Устойчивая циркуляция ВОМ происходит по схеме: дикорастущие резервуары вируса – переносчики – культурные растения – переносчики – дикорастущие растения.

Вирус идентифицировали из многих цветочных растений: гладиолуса (Bridgmon, Walker, 1952), георгины (Lawson, 1966), нарцисса (Brunt, 1966), дельфиниума, лилии, примулы, петунии, флокса, циннии (Станюлис и др., 1977). На юге ДФО вирус кроме перечисленных выше декоративных растений заражал также канны, эхинацею, банан, бальзамин, хризантему, фикус, фатсхедеру, катлею, фаленопсис, камбрию, тюльпан, мальву, львиный зев и др.

В Приморском крае ВОМ выявлен и из такой не специфической для него культуры, как картофель (Рейфман и др., 1996; Романова и др., 2000). Однако ВОМ широкого распространения в посадках картофеля не имел. Отмечено только, что нередко он встречался в смешанной инфекции с виридом веретенковидности клубней картофеля. Вероятнее всего, на посадки картофеля ВОМ, являясь природно-очаговым вирусом, заносился тлями, питающимися на других видах восприимчивых к вирусу растений, в которых он обычно накапливается в высокой концентрации.

**Передача.** ВОМ не передается семенами (исключение составляют бобовые штаммы) и через почву. Распространение инфекции происходит с посадочным материалом и с помощью насекомых-переносчиков – тлей, которых, как мы уже упоминали выше, известно более 75 видов (Roossinch, 2001). Главными из них являются два – *Aphis gossypii* и *M. persicae*. Вместе с тем известно, что некоторые штаммы вируса затруднительно и даже невозможно передать с помощью переносчиков (например, ВОМ-М). Исследование таких штаммов показало, что способность вируса к передаче тлями управляется не геномной РНК 3 и ее продуктом, а именно белком оболочки (Mossop, Francki, 1977; Gera et al., 1978; Chen, Francki, 1990).

Анализ аминокислотной последовательности КБ спонтанного мутанта ВОМ, отличающегося неэффективностью передачи тлями, позволил обнаружить замену аланина в позиции 162 на треонин. Предположительно, что основой неспособности передаваться с помощью переносчиков стала нестабильность вириона. Более того, установлено, что способность к передаче разными видами тлей (а именно *Aphis gossypii* и *M. persicae*) управляется различными участками гена белка оболочки (Perry et al., 1998). Эффективность передачи ВОМ насекомыми также зависит от наличия (или отсутствия) сат-РНК. Присутствие последней в зараженном растении коррелирует с уменьшением продуктивности передачи вируса тлями с 86–90 % до 65–35 % (Eseriu et al., 2000).

Кроме того, вирус легко передается механически. Но, как показывают экспериментальные данные, через почву он не передается (Pares, Gunn, 1989). Семенная



передача отмечена для некоторых бобовых штаммов вируса, но следует заметить, что обычные штаммы через семена зараженных растений не передаются.

Основными тест-растениями для диагностики инфекции ВОМ являются *Chenopodium amaranticolor*, *Ch. murale*, *Ch. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, *Petunia hybrida*, *Sinapis alba*. На инокулированных листьях *Ch. amaranticolor* и *Ch. murale* развиваются некротические поражения, на листьях *Ch. quinoa* – локальные хлоротичные повреждения. Растения *Cucumis sativus* реагируют системной мозаикой и крапчатостью. На молодых листьях *N. tabacum* cv. Samsun, *N. glutinosa*, как правило, развивается системная мозаика, а на растениях *P. hybrida* – посветление жилок и крапчатость верхних листьев.

В 80-х гг. XX века были проведены исследования с целью определения детерминант, определяющих характер реакций растений на заражение вирусом. Создание псевдорекомбинантов разных штаммов ВОМ и их биологическое тестирование позволило выяснить роль в этом отдельных компонентов генома. Было обнаружено, что наибольшая роль в индукции вирусом симптомов принадлежит геномной РНК 2. Например, в ней находится ген, определяющий возникновение у растения-хозяина деформации листьев. Способность штаммов вируса системно заражать дурман обыкновенный *D. stramonium* и *Solanum melongena* управляется взаимодействием генов РНК 2 и РНК 1 (или РНК 3) (Rao, Francki, 1982).

Детерминанта, определяющая индукцию хлороза у табака в ответ на заражение ВОМ, была картирована в гене белка оболочки РНК 3 (Suzuki et al., 1995). Исследование было проведено со штаммом ВОМ-У, известным тем, что он индуцирует суровый хлороз листьев растений табака. Показано, что в индукцию хлороза включена аминокислота белка оболочки в позиции 129, а именно серин. Замена серина 129 на пролин 129 ведет к изменению фенотипа и развитию симптомов зеленой мозаики.

Изучены физические свойства вируса: ТТИ – 60–70 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ in vitro при комнатной температуре – 3–5 дней.

**Вирусные включения.** В клетках пораженных растений ВОМ образует включения. Таковые обнаружены в эпидермальных клетках и клетках мезофила ткани листа перца *Cucumis sativus* и *N. edwardsonii*. Описаны два типа включений: гексагональные кристаллы, скорее всего, пустотелые, которые меньше по сравнению с ядром клетки, и пластинки, которые крупнее ядер (Moorman, Woodbridge, 1983).

**Антигенные свойства.** ВОМ – слабый иммуноген. Как правило, поликлональные антисыворотки, полученные к ВОМ, имеют невысокий титр и реагируют с гомологичным антигеном в разведении 1:128, 1:256 или 1:512 (Rao et al., 1982). Низкая иммуногенная активность вируса, считается, связана с нестабильностью структуры капсида вируса в присутствии электролитов. Для повышения иммуногенности КБ вируса и стабилизации структуры вириона применяют методику обработки очищенного препарата ВОМ формалином (Francki, Nabili, 1972).

Некоторые исследователи (Kiryama, Oshumi, 1973; Kiriyama, 1975) выделили среди штаммов ВОМ сильные иммуногены, к которым получают антисыворотку с высоким титром антител, и слабые, к которым трудно или невозможно получить Ас. По

результатам наших исследований ко второй группе были отнесены дальневосточные изоляты ВОМ, выделенные из смородины и конских бобов.

В начале 70-х гг. прошлого века было показано, что популяция ВОМ в антигенном отношении неоднородна (Devegne, Cardin, 1973). Девегне и Кардин семь исследуемых изолятов вируса разделили на две серогруппы: ToRS (группа-I) и DTL (группа-II). Использование антисыворотки позволило авторам установить наличие на поверхности капсида ВОМ 12 возможных видов эпитопов. Анализ 109 изолятов ВОМ, собранных в разных регионах мира, показал, что 70 % их принадлежит к группе-I и лишь 20 % – к группе-II. Остальные изоляты не могут быть отнесены ни к одной из указанных групп. Применение мышиных моноклональных антител дало возможность обнаружить у ВОМ наличие 10 видо- и родоспецифических эпитопов (Porta et al., 1989; Hsu et al., 2000).

Кроме того, обнаружено, что антигенные свойства ВОМ коррелируются с другими критериями идентификации, в частности биологическими свойствами вирионов и степенью гомологии последовательности РНК. Изоляты, характеризующиеся сходными симптомами на тест-растениях и высокой степенью гомологии РНК, оказываются и антигеннородственными (Owen, Palukaitis, 1988; Wahyuni et al., 1992).

В конце прошлого века ВОМ выявили в Приморском крае сначала на овощных культурах – томатах, перцах и огурцах (Теплоухова и др., 1987), на кормовых бобах и сое (Поливанова, 1971; Поливанова и др., 1981), позже на картофеле и кабачках (Gnutova et al., 1995; Романова и др., 2000), а также на ягодных кустарниках (Gordeichuk et al., 1977) и многих однолетних и многолетних цветочных растениях открытого и закрытого грунта (Гнутова и др., 1985; Крылов, 1992). В последние годы на юге ДФО на результатах скрининга различных сортов и видов растений показано, что ВОМ поражает многие виды растений культурной и дикой флоры. ВОМ не передается семенами (исключение – бобовые штаммы) и через почву, но довольно легко распространяется тлями и с посадочным материалом. Своеобразные климатические условия ДВ России (высокая влажность, большой перепад температур в летнее время, обилие тлей) создают довольно высокий инфекционный фон. Ниже мы приводим результаты наших исследований по идентификации дальневосточных изолятов ВОМ из овощных, декоративных, бобовых культур и ягодников.

### Изоляты ВОМ, поражающие ягодные кустарники

Вирус был обнаружен на смородине и малине (Gordeichuk et al., 1977). По данным исследований, растения смородины имели сильно морщинистые листья, дольки листа вытянуты, ткань по жилкам желтовато-зеленого цвета. Молодые листочки на таких растениях имели симптомы крапчатости. Крапчатость по краям листа отмечалась и на отдельных листьях среднего яруса. Соцветия у больных растений сильно осыпались, но оставшиеся завязи формировали полноценные плоды. Авторы отмечали и другие симптомы на смородине в виде слабой крапчатости и водянистых разводов по краям листа. С развитием растений эти симптомы исчезали, и только внутри



куста на отдельных листьях можно было заметить слабые водянистые разводы. На черенках в тепличных условиях крапчатость сохранялась в течение всего сезона вегетации и наиболее ярко проявлялась на осеннем приросте. Обратная передача инфекции на здоровые растения смородины и малины посредством прививки показала, что типичные симптомы поражения появляются у них после периода покоя. При заражении сеянцев смородины ранней весной в теплице и последующем выращивании в открытом грунте слабую крапчатость на листьях можно было наблюдать спустя 2–3 мес. Механически вирус на ягодники передавался крайне редко, чаще всего со стабилизаторами. Семенная передача ВОМ до 70 % была характерна для растений смородины, на листьях которой отмечались очень яркие симптомы поражения. Причем по мере развития растений в тепличных условиях симптомы усиливались, в открытом грунте – маскировались, оставаясь только на нижних листьях.

На растениях малины (на листьях осеннего прироста), по данным О.Г. Гордейчук с соавт. (1977), была отмечена яркая крапчатость, слабая морщинистость. На жимолости *Lonicera edulis* Turcz., пораженной ВОМ, наблюдали на молодых листьях белую крапчатость. В процессе вегетации крапчатость ослаблялась и вновь ярко проявлялась на листьях осеннего прироста.

### Изоляты ВОМ, поражающие овощные культуры

В последние годы в ДФО возросла распространенность ВОМ на овощных культурах (перцы, огурцы, томаты, кабачки, тыква и др.). Нередко вирус обнаруживали в смешанной инфекции с ВТМ. В таком случае потери урожая овощных культур были довольно существенны и составляли иногда от 80 до 100 %. Известно, что степень вредоносности вируса во многом зависит от штамма (изолята) и восприимчивости культивируемого сорта.

**Приморские изоляты.** Первоначально в Приморском крае на овощных культурах в 90-е годы прошлого века ВОМ был идентифицирован из перца (Шафрановская и др., 1993) с симптомами хлоротичной крапчатости, деформации листьев и карликовости и из кабачка (Gnutova et al., 1995). Было установлено, что коллекционные и селекционные питомники овощных культур на юге Приморья (ПССО, с. Суражевка) на 50–80 % поражены ВТМ и ВОМ. В фермерских хозяйствах также был отмечен большой процент поражения овощных культур ВОМ (тыквы, томаты) и ВТМ (перцы). С каждым последующим годом количество поражаемых этими вирусами растений увеличивалось (Гнутова, Толкач, 2008).

**Изолят ВОМ из перца** заражал растения 23 видов, в том числе огурец, дурман обыкновенный, томат, табак сорта Самсун, фасоль и бобы. ТТИ вируса была 70 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 5 сут, полученные результаты совпадали с данными, описанными в литературе для обычного штамма ВОМ.

В 2002 г. нами был идентифицирован *корейский изолят ВОМ из перца*. Он был обнаружен в посадках перца нами во время маршрутных исследований в КНДР (окрестности г. Пхеньяна) и использован для сравнительной характеристики с российскими

дальневосточными изолятами ВОМ. От них он отличался более узким кругом экспериментально поражаемых растений.

Изолят ВОМ из кабачка вызывал у больных растений отставание в росте, листья имели хлоротичную окраску. Верхние листья были деформированы за счет стягивания центральной жилки. Изолятом удалось заразить растения 35 видов из различных семейств. ТТИ – 70 °С, ПСИ – 3 сут, ПСИ –  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ .

Физико-химические и антигенные свойства изолятов из перца и кабачка. Были получены очищенные препараты этих изолятов ВОМ, которые накапливались нами в растениях табака сорта Ксанти. Выход вируса составил 320 мг/кг. Электрофоретический анализ вирусспецифических белков изолятов показал наличие в вирусных препаратах пептида с м.м. 28–30 кДа. Изоляты оказались слабыми иммуногенами. Титр специфических антител в антисыворотке по результатам РДД был 1:8–1:16, в непрямом варианте ИФА – 1:600–1:1000. Сравнительный анализ наших и литературных данных (Наак, Richter, 1987) свидетельствовал о возможности отнесения их к ВОМ группы-I.

Изоляты из томата (ВОМт), баклажана (ВОМб), перца (ВОМп) и огурца (ВОМо) были выявлены в Приморском крае (Толкач, Гнутова, 1998, 2001; Чернявская и др. 2002; Чернявская, 2003). Была проведена сравнительная характеристика изолятов ВОМ главным образом по биологическим и антигенным свойствам. В эксперименте вирус удалось механически передать на растения из семи семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* и *Solanaceae* (табл. 19).

Таблица 19

Реакция тест-растений на заражение дальневосточными изолятами ВОМ

Растения семейства, вида, сорта	Изоляты ВОМ			
	Перец	Огурец	Баклажан	Томат
<i>Aizoaceae</i>				
<i>Tetragonia expansa</i>	L: ClSp	L: ClSp	–	L: ClSp
<i>Amaranthaceae</i>				
<i>Gomphrena decumbens</i>	L: ClSp	L: ClSp	L: ClSp	L: ClSp
<i>Chenopodiaceae</i>				
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L: N	L: N	L: N	L: N
<i>Ch. ambrosoides</i>	L: NR	L: NR	L: NR	L: NR
<i>Ch. guinoa</i>	L: N	L: N	L: N	L: N
<i>Compositae</i>				
<i>Zinnia elegans</i>	S: M	S: ClM, Dis	L: ClSp; S: M	S: M
<i>Cucurbitaceae</i>				
<i>Cucumis metuliferus</i>	–	–	S: ClSp	S: ClM, Dis
<i>C. sativus</i> , сорта:				
Водолей	–	S: VeBd	–	–
Дальневосточный-6	S: RM	S: ClMot	S: M	S: Mot
Изящный	S: M, Dis	S: ClMot	S: ClMot	S: RM



Растения семейства, вида, сорта	Изоляты ВОРМ			
	Перец	Огурец	Баклажан	Томат
Каскад	S: CIM	S: CIM	S: CIM	S: M
Кит	S: ClVe	S: ClSp	S: CIM	S: ClMot
Маркетер	S: M	S: ClMot	S: CIM	S: M
Миг	S: M	S: Mot, M	S: M	S: CIM
Феникс-640	S: M	S: CIM	S: CIM	S: CIM
<i>Cucurbita maxima</i>	S: ClSp, Dis	S: ClSp, Dis	S: ClSp, Dis	S: ClSp, Dis
<b><i>Fabaceae</i></b>				
<i>Dolichos lablab</i>	L: ClSp	L: ClSp	L: ClSp	L: ClSp
<i>Faba bona</i>	—	L: N	L: N	—
<i>Vigna angularis</i>	—	—	L: N	—
<i>V. sinensis</i>	—	—	L: N	—
<b><i>Solanaceae</i></b>				
<i>Capsicum annuum</i> , сорта:				
Виктория	S: ClMot	S: M	—	S: M
Ласточка	S: RM	S: CIM	S: ClMot	S: RM
Подарок Молдовы	S: ClMot	S: M	S: ClMot	—
<i>Datura stramonium</i>	—	L: ClSp; S: ClSp, Dis	S: ClMot, Dis	S: M
<i>Hyoscyamus niger</i>	—	S: ClMot, Dis	S: ClVe	S: CIM, Dis
<i>Lycopersicon esculentum</i> , сорта:				
Белый налив	S: M, Dis	S: CIM	S: CIM	S: Dis
Волгоградский	S: CIM, Dis	S: CIM, Dis	S: CIM, Dis	S: M, Dis
Одиссей	S: M	S: CIM, Dis	S: CIM	S: ClSp, M
Сен-Пьер	S: CIM	S: M, Dis	S: CIM	S: CIM, Dis
Флорида петит	S: CIM, Dis	S: CIM, Dis	S: ClVe, Dis	S: Dis
Хабаровский-308	S: M, Dis	S: ClVe, Dis	S: CIM, Dis	S: M, Dis
Эхо	S: M	S: CIM, Dis	—	S: ClSp, Dis
<i>Nicandra physaloides</i>	S: ClVe, ClSp	L: ClSp; S: ClMot, Dis	L: ClSp; S: ClMot, Dis	L: ClSp; S: Dis
<i>Nicotiana fruticosa</i>	S: M	S: ClVe	S: CIM	S: M, Dis
<i>N. glutinosa</i>	S: M, Dis	S: ClVe	S: VeBd, Dis	S: CIM, Dis
<i>N. tabacum</i> , cvs:				
Samsun	S: M	S: CIM, Dis	S: CIM, Dis	S: CIM
Xanthi	S: M	S: CIM, Dis	S: CIM	S: M, Dis
<i>Petunia hybrida</i>	S: M, Dis	L: ClSp; S: ClVe, Dis	—	S: CIM, Dis
<i>Solanum melongena</i> , сорта:				
Донской	S: Sp	S: CIM	S: ClSp	—
Сериал	S: ClSp, Dis	S: ClSp, Dis	—	—
<i>S. nigrum</i> L.	S: ClVe	S: ClVe, M	S: CIM	—

Все изучаемые изоляты ВОМ легко заражали растения *Gomphrena decumbens* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *Ch. ambrosoides* L., *Ch. quinoa* Willd., *Zinnia elegans* Jack., *C. sativus*, *C. maxima*, *Dolichos lablab* L., *Capsicum annuum* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Nicandra physaloides* (L.) Gaerth., *N. fruticosa* L., *N. glutinosa* L., *N. tabacum* cvs. Xanthi и Samsun. Симптомы у данных тест-растений после заражения соответствовали литературным данным (рис. 22). Следует особо подчеркнуть, что растения семейства *Fabaceae* всегда поражались локально, что свидетельствовало о том, что изучаемые изоляты не относились к группе бобовых штаммов ВОМ.

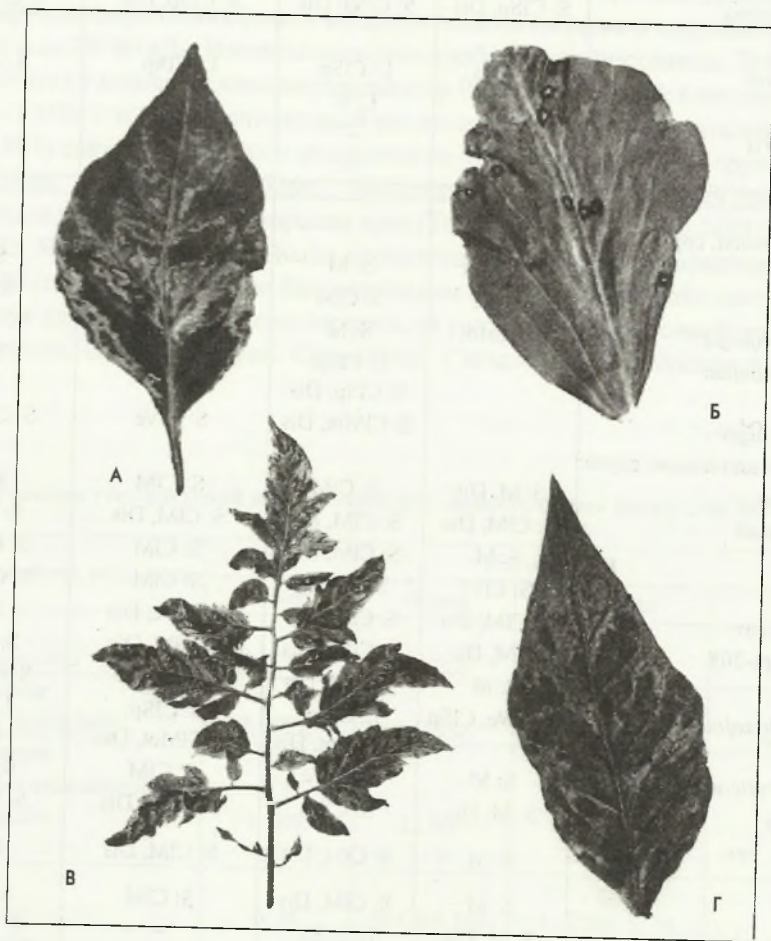


Рис. 22. Симптомы тест-растений на заражение различными изолятами ВОМ. А – реакция перца *Capsicum annuum* сорта Ласточка на изолят из огурца; Б – локальные некрозы на листе конских бобов *Faba bona*, пораженных изолятом из перца; В – системное поражение томата сорта Волгоградский изолятом ВОМ из баклажана; Г – поражение табака *N. tabacum* cv. Xanthi изолятом из баклажана



Вместе с тем каждый изолят имел характерные особенности, отличающие его от других изолятов. Так, ВОМп не заражал растения *C. metuliferus*, *C. sativus* сорта Водолей, *Datura stramonium* и *Hyosciamus niger* L. ВОМо не удалось передать на растения *C. metuliferus*. При этом данным изолятом заражались растения *C. sativus* сорта Водолей, которые к другим изучаемым изолятам вируса оказались устойчивыми. Особенности ВОМб заключались в том, что им не поражались растения *T. expansa*, *C. annuum* сорта Виктория, *L. esculentum* сорта Эхо, *Petunia hybrida* Vilm. и *Solanum melongena* L. сорта Сериал. Вместе с тем данный изолят был передан на растения *C. metuliferus*, *Vigna angularis* Willd. и *V. sinensis* (Hassk.) Endl. Растения двух последних видов реагировали на заражение ВОМб локально.

Ни одним из изолятов не удалось заразить *Amaranthus caudatus* L., *Antirrhinum majus* L., *Atropa belladonna* L., *Campanula barbata* L., *Inula ensifolia* L., *Lavatera arborea* L., *Raphanus sativus* L., *Trifolium alpestre* L., *Vigna unguiculata* Walpers.

Интересен был и тот факт, что ВОМо и ВОМб вызывали местную некротическую реакцию у растений *Faba bona* Medic., в то время как двумя другими изучаемыми изолятами, ВОМп и ВОМт, заразить это растение не удалось. Также ВОМт не заражались растения *C. annuum* сорта Подарок Молдовы, *S. melongena* и *Solanum nigrum* L. Реакции же других тест-растений на инокуляцию этим изолятом были сходны с результатами исследования остальных изолятов ВОМ (рис. 23).

Таким образом, круг экспериментальных растений-хозяев и симптомы заболевания, вызываемые овощными приморскими изолятами, были характерны для ВОМ и сходны, но не идентичны. Результаты изучения биологических свойств изолятов ВОМ, выявленных на культурных растениях семейств *Cucurbitaceae* и *Solanaceae* – огурце, перце, томатах, а ранее кабачке и перце, позволяют отнести их к ВОМ группы-I.

Для сравнительной характеристики приморских изолятов ВОМ был получен очищенный препарат изолята ВОМ из огурца. Средний выход вируса составил 158,3 мг/кг зараженного материала. Этот результат свидетельствует о более низкой концентрации изолята в растениях *N. tabacum* cv. Xanthi по сравнению с ранее изученными дальневосточными изолятами ВОМ (Гнутова и др., 1985).

Физические свойства изучаемых изолятов ВОМ хотя и оказались весьма близки, но не одинаковы. Они соответствовали литературным данным для обычного штамма вируса, но немного отличались от свойств ранее идентифицированных в Приморье изолятов ВОМ из перца и кабачка (ВОМкаб) (табл. 20).

Таблица 20

Физические свойства приморских изолятов ВОМ

Изоляты ВОМ	ТТИ, °С	ПСИ, сут	ПРС
ВОМп	60	2	$10^{-4}$
ВОМо	60	3	$10^{-2}$
ВОМб	60	3	$10^{-3}$
ВОМт	65	4–5	$10^{-3}$
ВОМкаб*	70	3–5	$10^{-3}$ – $10^{-5}$
ВОМ**	55–70	1–10	$10^{-3}$ – $10^{-6}$

\*По: Gnutova et al., 1995. \*\*По: Brunt et al., 1997.

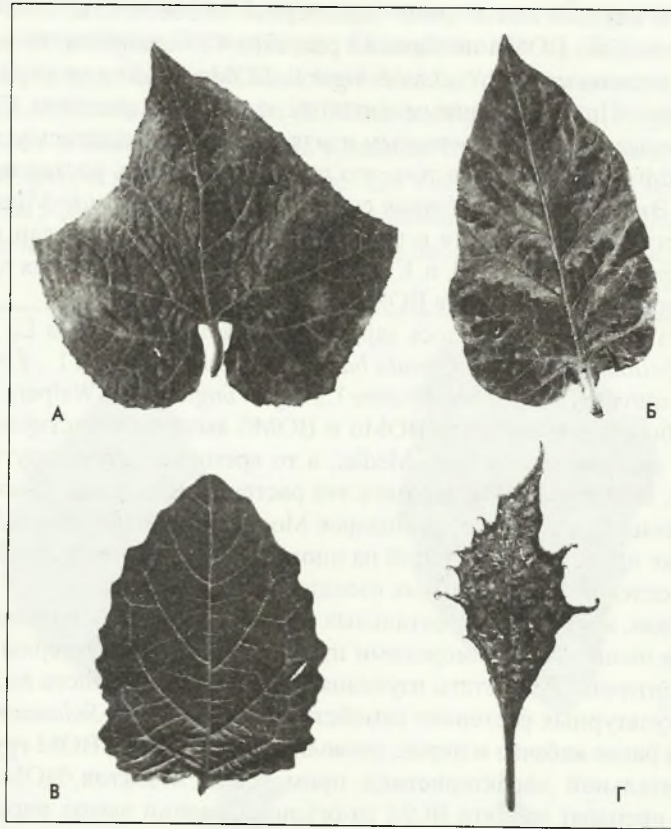


Рис. 23. Реакция тест-растений на заражение ВМ. А – *C. metuliferus* (огурец африканский), пораженный изолятом ВМ из томата; Б – симптомы поражения *N. tabacum* cv. Ханти изолятом ВМ из огурца; Г – поражение *Nicandra physaloides* изолятом ВМ из перца мозаичного; В – лист здорового растения

Иммуногенные свойства капсидных белков ВМО были усилены в результате стабилизации БО формалином. Антисыворотка, приготовленная к формализированному иммуногену ВМО, в РДД имела довольно высокий титр – 1:1024 (рис. 24), была строго специфична, так как не реагировала с соком здоровых растений, что имело большое практическое значение при ее использовании с диагностической целью.

Антисыворотки, полученные к дальневосточным изолятам ВМ ранее, как правило, имели титр в РДД не более 1:64–1:128 (Гнутова, 1993). Использование высоко активной гомологичной Ас позволило изучить антигенные взаимоотношения между приморскими изолятами ВМ. Изучаемые изоляты, выявленные нами на овощных культурах, в РДД формировали идентичные полосы преципитации (рис. 25), что свидетельствовало об их близком антигенном родстве.

Приморские изоляты ВМ, обнаруженные на перце, кабачке, баклажане, томате, по биологическим и антигенным свойствам отнесены к группе-I штаммов ВМ.



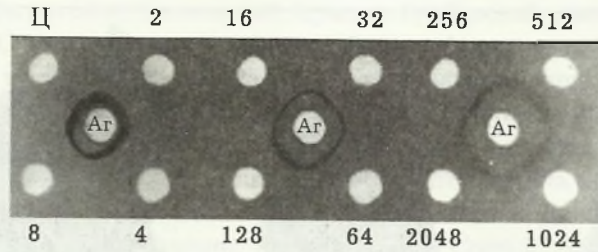


Рис. 24. Титр специфических антител против ВОМо в РДД. В центральных лунках – антиген (концентрация 1 мг/мл), в периферических – Ас в разведениях 2, 4 ... 16 и т. д.

**Хабаровские изоляты.** В пойме реки Амур в Хабаровском крае нами с 2002 г. ежегодно проводится фитовирусологический мониторинг овощных культур.

**Изолят ВОМ из томата.** В 2003 г. по просьбе сотрудников отдела защиты растений ДальНИИСХ РАСХН ДВНМЦ был обследован в окрестностях г. Хабаровска коллекционный участок томатов на наличие растений с вирусоподобными симптомами. Был взят для исследований образец томата сорта Красный великан с деформацией и ярким хлорозом участков ткани листа и сильной задержкой роста растения. Для идентификации этого патогена использовали растения из семейств *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Umbelliferaeae*. Вирусом удалось заразить 35 видов и сортов растений, причем 31 вид и сорт растений поражались системно. Параллельно проводили выявление некоторых сортов овощных культур (томата, тыквы, огурца и кабачка), устойчивых к изучаемому изоляту вируса.

Табак настоящий сортов Xanthi и Samsun реагировал на заражение системной яркой хлоротичной пятнистостью, крапчатостью, хлорозом жилок (рис. 26), подобные симптомы отмечали и на табаке клейком *N. glutinosa*, дурмане инноксия *Datura innoxia*, махорке *N. rustica*, петунии гибридной *Petunia hybrida*. Салат посевной *Lactuca sativa* сорта Лолло-Россо заражался вирусом бессимптомно. Кабачки *Cucurbita pepo* сортов Негритенок и Цукеша и патиссон *C. pepo* var. *Patisson* сорта Чебурашка реагировали на заражение как локально, так и системно.

С помощью электронного микроскопа в препарате, приготовленном из сока растений, зараженных вирусом, обнаружены сферические частицы размером около 30 нм.

Изучали физические свойства вируса. Результаты наших исследований показали, что ГТИ > 65 < 70 °С, ПСИ – 1 сут и ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ .

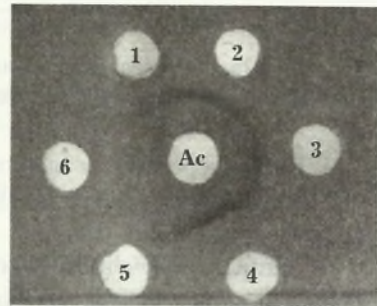


Рис. 25. Изучение антигенного родства изолятов ВОМ методом РДД. В центре – Ас против ВОМо, по периферии – сок растений *N. tabacum* cv. Xanthi, зараженный изолятами: 1 – ВОМц, 2 – ВОМт, 3 – ВОМб, 4 – ВОМо, 5, 6 – контроль (сок здоровых растений)



Рис. 26. Системная реакция на заражение хабаровским изолятом ВОМ из томата: А – на табаке; Б – на томате сорта Белый налив, справа – лист здорового растения томата

Вирус передавался тлей персиковой *M. persicae*.

Исследуемый изолят в РДД формировал в 1 %-ном агаре полосу преципитации с антисывороткой к ВОМо.

Данные, полученные при изучении экспериментального круга растений-хозяев, передачи вируса тлями, морфологии вирионов, антигенного родства изучаемого изолята из томата с приморским изолятом ВОМ из растения огурца, позволили сделать заключение, что в Хабаровском крае на томате идентифицирован ВОМх/т.

На успех выращивания безвирусного материала овощных культур важнейшую роль оказывает химическая борьба с насекомыми – переносчиками вирусов. Но самый эффективный метод борьбы с вирусами – селекция устойчивых к вирусам сортов и гибридов. Нами изучены на устойчивость к хабаровскому изоляту вируса ВОМ из томата следующие растения: огурец посевной сортов Лотос, Родничок, Восток, ДВ-6; тыква крупноплодная сортов Улыбка, Россиянка, 100-фунтовая, Атлант, Миндальная;



кабачок сортов Негритенок, Сосновский, Цукеша, Грибовский; дыня золотистая сортов Колхозница, Сладкий ананас. Кроме того, были инфицированы ВОМх/т патиссон сорта Чебурашка и арбуз сорта Астраханский. Устойчивыми к вирусу оказались растения огурца посевного сортов Родничок, ДВ-6; тыквы крупноплодной сортов Россиянка, 100-фунтовая, Миндальная; дыни сортов Золотистая и Колхозница, а также патиссон сорта Чебурашка и арбуз сорта Астраханский. На устойчивость к ВОМт/х изучены томаты 16 сортов: Колхозница, Отличник, Де-барао, Новичок, Дальневосточная роза, Рома, Факел, Дубок, Черный принц, Ясный, Новато, Союз-8, Дар Завожья, Хурма, Оранжевые сливки и Белый налив. Устойчивыми к вирусу оказались такие сорта томата, как Новато, Дубок, Хурма, Оранжевые сливки и Белый налив. Таким образом, все вышеперечисленные сорта овощных культур, устойчивые к ВОМх/т, можно рекомендовать для выращивания в условиях Хабаровского края, что позволит повысить урожайность этих культур и получать более качественную продукцию.

Изолят ВОМ из тыквы был выявлен в частных посадках в окрестностях Хабаровска с симптомами сильной задержки роста растения. Им инокулировали 45 видов и сортов растений из семейств *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*, *Umbelliferaeae*. Вирусом удалось заразить 28 видов и сортов растений из семейств *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*, *Scrophylariaceae*, *Umbeliferaceae*.

Симптомы, полученные на тест-растениях после заражения вирусом, были характерны для вируса огуречной мозаики. Табак настоящий *N. tabacum* cvs. Samsun и *Xanthi* реагировали на заражение хлоротичной мозаикой, папоротниковидностью, деформацией и измельчением листа. Львиный зев *Antirrhinum majus* отвечал на инфицирование сильным измельчением пластинки листа и задержкой роста растения. На *P. hybrida* реакция поражения проявлялась в виде уродливости листовой пластинки, темно-зеленых вздутых пластинки листа и сильной деформации. На перце однолетнем *Capsicum annuum* вирус вызывал хлоротичную штриховатость и деформацию листьев.

Физические свойства изолята вируса из тыквы (ВОМтык/х) соответствовали следующим показателям: ТТИ >65<70 °С, ПРИ – 10<sup>-4</sup>–10<sup>-5</sup>, ПРС – 1 сут.

Вирус легко передается *M. persicae*.

Не выявлена семенная передача у *N. tabacum* cv. Samsun, зараженного ВОМтык/х. В эксперименте проверено 78 семян табака.

В процессе изучения экспериментального круга растений-хозяев вируса проводили выявление устойчивых сортов томата. Вирусом инокулировали 20 сортов: Рома, Хаб-308, Невский, Союз-8, Сен-Пьер, Отличник, Де-Барао, Дальневосточная роза, Дубок, Факел, Черный принц, Ясный, Дар Заволжья, Хурма, Новато, Оранжевые сливки, Белый налив и Розовый сливовидный. Устойчивыми к изоляту ВОМтык/х оказались 6 сортов: Новато, Дубок, Рома, Дальневосточная роза, Новичок и Союз-8. Таким образом, из семейств *Solanaceae* и *Cucurbitaceae* выявлены сорта овощных культур как устойчивые, так и восприимчивые к ВОМтык/х. Вирусоустойчивые сорта выявленных овощных культур можно рекомендовать овощеводам для районирования в Хабаровском крае.

Хабаровские изоляты ВОМ из тыквы и томата сорта Красный великан по биологическим свойствам незначительно отличались от изолятов ВОМ, обнаруженных на овощных культурах в Приморском крае, и от обычного штамма ВОМ (Brunt et al., 1995) и отнесены к группе-1, как и приморские изоляты ВОМ.

Была проведена сравнительная характеристика биологических (табл. 21) и физических (табл. 22) свойств вирионов приморских и хабаровских изолятов ВОМ, выявленных на растениях семейств *Cucurbitaceae* и *Solanaceae* (томат, дыня, тыква, арбуз, перец, огурец) в начале этого столетия. Установлено, что эти изоляты ВОМ принадлежат к группе обычных штаммов ВОМ дальневосточного серотипа рода *Cucumovirus* сем. *Bromoviridae*.

Таблица 21

Реакция тест-растений на заражение изолятами ВОМ, выявленными в Приморском и Хабаровском краях

Тест-растения	Хабаровские изоляты				Приморские изоляты	
	Тыква	Томат	Перец	Дыня	Томат	Арбуз
<i>Antirrhinum majus</i>	S: Dis, M	S: Dis, Stu	S: Cl, Dis	S: Cl, Stu, Dis	S: CIM, Dis	S: Stu, Dis
<i>Apium graveolens</i> , сорт Паскаль					-	
<i>Am. hybridum</i>						
<i>Balsamin</i> sp.	-					
<i>Cucumis sativus</i> , сорта:						
Логос	S: ClVe, M	S: ClSp, Dis			-	
Родничок	-	-			S: CIMot	
ДВ-6	-	S: CIMot	-	-	S: CIMot	
Усс-3						-
Восток	S: ClVe, M	-		S: ClVe, Roll	S: CIMot	
Хабар					S: CIMot	-
Феникс						
Каскад						S: ClVe, GrM
ДВ-27						
<i>Ch. quinoa</i>	L: N	-		-		-
<i>Ch. murale</i>	-		-			
<i>Capsicum annuum</i> , сорт Богатырь	-	S: ClVe, Dis	S: ClVe, M	-	S: Stu, Cl, Dis	-
<i>Citrullus vulgaris</i> , сорт Астраханский	-					
<i>Cucurbita maxima</i> , сорта:						
Ананасная						
Улыбка	S: ClVe, Dis					



Тест-растения	Хабаровские изоляты				Приморские изоляты	
	Тыква	Томат	Перец	Дыня	Томат	Арбуз
Россиянка	—					
100-фунтовая	—					
Атлант	—					
Миндальная	—					
<i>C. melo</i> , сорта:						
Золотистая	—					
Колхозница	—					
Сладкий ананас	S: ClVe, ClMot					
<i>C. pepo</i> , сорта:						
Негритенок	L: ClSp, S: ClMot					
Сосновский	S: ClSp ClVe					
Цукеша	L: ClSp S: ClSp					
Грибовский	L: ClSp S: ClSp ClVe					S: ClMot
Желтоплодный						S: ClMot
<i>C. pepo</i> var. <i>patisson</i> , сорта:						S: GrBd, Ve, Grm
Зонтик						S: ClMot
Белый						S: ClMot
<i>Datura stramonium</i>	S: ClMot, Dis	—		—		
<i>D. innoxia</i>	S: Dis, M	S: ClSp, Dis	—	—	—	—
<i>D. ferox</i>	—	—			—	
<i>Faba bona</i>	—					L: N
<i>Hyoscyamus niger</i>	—	S: M		—		
<i>H. alba</i>	—					
<i>Gomphrena globosa</i>	S: ClMot, Dis	—		—		
<i>Lactuca sativa</i> , сорт Лолло-Россо	S: O	S: O			—	
<i>Lycopersicon esculentum</i> , сорта:						
Союз-8	S: VC, Dis	—		—		
Отличник	S: Stu, ClsStr	—				
Колхозница	S: Cl, Dis					
Моравское чудо			S: Dis			

Тест-растения	Хабаровские изоляты				Приморские изоляты	
	Тыква	Томат	Перец	Дыня	Томат	Арбуз
Пирсон						
Оранжевые сливки	—	S: CIMot, Dis			S: CIMot	
Волгоградский						
Белый налив	—	S: Dis, CIMot				
Одиссей						
Новичок	S: Stu, CIM	—		—	—	—
Невский						
Дар Заволжья	S: Cl	S: ClVe, CIMot			S: Dis, Stu	
Хабаровский розовый			S: CIM, Dis, Stu			
Марманде						
Хурма	—	S: CIMot, Dis			S: GrMot, Dis	
Рома	S: ClStr	—			—	
Титан					—	
Хабар-308					—	
Черный принц	S: CIM, Dis	S: CIM	S: CIMot			
Де барао	S: ClVe, Dis	S: Cl, Dis			—	
Дальневосточная роза	S: ClStr	—				
Факел	S: M, Dis	S: GrMot			S: GrMot, Dis	
Дубок	—	—	S: Cl, Dis	—	—	
Ясный	S: VC, DisVe	S: M, Dis			S: GrMot, Dis	
Новато	—	—				
Пиннокио			S: ClVe, Stu			
Эхо			S: CIM, Dis			
Невский			—		—	
<i>Nicotiana tabacum</i> , cv. Samsun	S: ClSp, Dis	S: ClVe Mot	S: GrM, ClVe	S: CIRM	S: ClVe, CIMot, Dis	
Xanthi	S: Cl, Dis	S: CIMot, Dis, ClVe, Stu		S: ClSp, ClVe, Mot		S: ClVe
<i>N. alata</i>	S: ClVe	—	S: ClVe, DisVe, Stu		S: ClVe	S: GrM, Stu



Тест-растения	Хабаровские изоляты				Приморские изоляты	
	Тыква	Томат	Перец	Дыня	Томат	Арбуз
<i>N. paniculata</i>	S: CIMot	S: CIMot, Dis	S: Stu, CIM			S: CIRM
<i>N. rustica</i>	S: Cl, Dis	S: Cl, Dis	S: Cl, CIMot, M	S: GrM, Cl, Dis	S: Dis, GrM	S: GrM
<i>N. glutinosa</i>	S: ClSp, Dis	S: ClI Mot, Did			S: Cl, M, Dis, Stu	S: CIM
<i>Nicandra physaloides</i>	S: ClVe, Dis	S: Dis, M, Cl	S: ClStu, Dis	S: CIM, Stu	S: ClVe, Dis, Stu	—
<i>Petunia hybrida</i>	S: ClVe, Cl	S: ClVe, Dis, CIMot	S: ClVe, GrM	S: GrM	S: CIMot, Dis	S: ClVe
<i>Physalis pubescens</i>						S: GrM, Stu
<i>Ph. floridana</i> , сорт Кондитерский	—	S: Cl, Dis			S: O	
<i>Phaseolus vulgaris</i> , cvs.: Michelite	—	—				—
Black	—	—				—
<i>Solanum melongena</i> , сорта: Донской	—					
Черный красавец	—				—	—
<i>S. nigrum</i>	—				S: ClVe, CIM	
<i>Tetragonia expansa</i>	—					
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	—					—
<i>Vigna unquiculata</i>	—	—				
<i>Vigna sinensis</i>	—				—	

Примечание. Прочерк означает — не заражается. Пустые графы — симптомов не наблюдали.

Таблица 22

**Физические свойства вирионов изолятов ВОМ, выявленных на овощных культурах в ДВ регионе**

Свойства	Изоляты					
	Хабаровские				Камчатский	Приморский
	Тыква	Дыня	Томат	Перец	Огурец	Томат
ТТИ, °С	65–70	45–50	65–70	65–70	55–60	75–80
ПРС	$10^{-3}$ – $10^{-4}$	$10^{-1}$ – $10^{-2}$	$10^{-4}$ – $10^{-5}$	$10^{-3}$ – $10^{-4}$	$10^{-1}$ – $10^{-2}$	$10^{-2}$ – $10^{-3}$
ПСИ, сут	1	Около суток	1	1	3	2

Следует отметить, что впервые за годы изучения вирусов растений в ДФО в двух регионах выявлен ВОМ – на дыне, тыкке, томате и перце (Хабаровский край) и на огурце сорта Клавдия (Камчатская край). Изучены не только их круг растений-хозяев, симптоматология и физические свойства вирионов (табл. 22), но и передача насекомыми и др. свойства. Для хабаровского изолята ВОМ из дыни: ТТИ – 45–50 °С, ПСИ – около сут., ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , для камчатского изолята ВОМ из огурца: ТТИ – 55–60 °С, ПСИ – 3 сут., ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$  (табл. 22).

### Изоляты ВОМ, поражающие декоративные культуры

В южных районах ДВР в 70-е годы прошлого столетия впервые ВОМ был выявлен на 8 видах естественно пораженных декоративных растений из различных семейств открытого и защищенного грунта: *Liliaceae*, *Iridaceae*, *Cannaceae*, *Musaceae*, *Primulaceae*, *Asrерасеае*, *Balsaminaceae*, *Eanunculaceae* (Чуян и др., 1978). Естественно пораженные растения имели характерные симптомы заболевания: на лилии тигровой *Lilium tigrinum* – светло-зеленая и буровато-зеленая (частично некротизированная) штриховатая мозаика с закрученными вниз листьями; на гладиолусе гибридном сорта Биби *Gladiolus hybridus* hort. – темно-окрашенные продолговатые пятна на лепестках цветков и светло-зеленые штрихи на листьях; на канне индийской *Canna indica* L. – чередующиеся полосы желтого и светло-зеленого цвета на листьях, а лепестки цветов имели продолговатые некротические пятна; на примуле обратноконической *Primula obconic* L. – морщинистая мозаика и легкая крапчатость на листьях, а также измельченность и обесцвеченная пятнистость цветков растения; на дельфиниуме гибридном *Delphinium hybridum* L. – желтая кольцевая пятнистость на листьях, цветки уменьшены в размерах, деформированы с бледной окраской; на эхинацее пурпурной *Echinacea purpurea* Moench. – в начале вегетации наблюдались посветление жилок, морщинистая мозаика, лепестки цветков вытянуты, с неровными краями; на бальзамине, или недотроге бальзаминовой, *Impatiens balsamina* L. – светлая окраска листьев, слабая облиственность и обильное цветение, листья и цветы со временем увядали и осыпались; на декоративном банане японском *Musa basioo* Sieb et Zucc. – листья светлее, чем у здоровых растений, с желтыми полосами, расположенными параллельно боковым жилкам, при этом окраска полос более интенсивна проявлялась весной на вновь отрастающих листьях, в летние месяцы желтые полосы покрывались точечными некрозами, которые со временем увеличивались в размерах и сливались между собой, превращаясь в прерывистые некротические полосы, пораженное вирусом растение отставало в росте. Позже эти авторы выявили ВОМ на хризантеме *Chrysanthemum* spp., на нарциссе *Narcissus hybridus* hort. и на тюльпане *Tulipa hybridus* hort.

Изучаемые изоляты ВОМ заразили 86 используемых в эксперименте сортов и видов растений и успешно переносились персиковой тлей.

**Антигенные свойства** изучены у изолятов ВОМ из лилии тигровой, эхинацеи пурпурной, бальзамина, канны индийской, хризантемы, тюльпана, нарцисса, примулы обратноконической, банана японского и гладиолуса гибридного, а также из сморо-



дины *Ribes niger* L. сорта Приморский чемпион, конских бобов и томата съедобного сорта Ревормун.

*Изоляты ВОМ из гладиолуса и примулы. Физико-химические и антигенные свойства.* В качестве антигена в иммунохимических реакциях и иммуногена при получении специфической антисыворотки применялся очищенный препарат вируса. Изоляты ВОМ из гладиолуса и примулы размножали и накапливали в растениях табака сортов Xanthi и White Barley. Листья с ярко выраженными симптомами снимали на 10, 20, 30 и 40-й дни после инокуляции. Сравнили несколько методик получения очищенного препарата вируса (Murant, 1965; Scott, 1963; Tomlinson et al., 1959), в том числе и модифицированную нами, которая заключалась в следующем. Свежесорванные листья гомогенизировали в 0,5 М фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,1 М тиогликолевой кислоты (1:1). Гомогенат встряхивали в течение 10–15 мин с хлороформом (1/8 объема), затем при 5000–6000 г 10 мин центрифугировали. Осадок отбрасывали, к надосадочной жидкости добавляли 8 % ПЭГ и 0,2 М NaCl и оставляли на 12–16 ч, после вновь центрифугировали 20 мин при 15000 г. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок растворяли в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5. Вирусную суспензию оставляли на 1,5–2 ч при 4 °С, затем центрифугировали 10 мин при 5000 г. Осадок отбрасывали, надосадочную жидкость подвергали 1–2 циклам дифференциального центрифугирования: 2 ч при 60000–70000 г и 10 мин при 12000 г. Очистку вируса проводили в холодной комнате при температуре 0–3 °С.

В литературе относительно сроков максимального накопления ВОМ в тест-растениях встречаются противоречивые данные. Ряд авторов показали, что это 10-й день от начала заражения (Tomlinson et al., 1959; Mink et al., 1975), другие – 28-й день (Richter et al., 1979). По результатам наших исследований, изоляты ВОМ максимально накапливались в растении на 12–14-й день. В это время мы получали самый высокий выход вируса – 185 мг на 1 кг исходного материала. В листьях, снятых на 30–40-й день для очистки вируса, отмечали значительную сорбцию вируса на компонентах клетки-хозяина. Замечено, что наиболее продуктивный период работы с ВОМ – весна.

Для сохранения инфекционности и уменьшения степени сорбции вируса на компонентах клетки-хозяина Томлинсон с соавт. (Tomlinson et al., 1959) подобрали надежный восстановитель – тиогликолевую кислоту. Осветление экстракта проводили *n*-бутанолом. Причем его 8,5 %-ная концентрация при введении оказалась критической, так как при 9 %-ной вирус инактивировался, а при 7 %-ной очистка была неэффективна.

Позже Х. Скотт (Scott, 1963) подтвердил, что эмульгирование сока *n*-бутанолом действительно устраняет связи между вирионами и клеточным материалом в гомогенате, но выход вируса при этом получался гораздо ниже, чем при хлороформном методе эмульгирования. А. Мурант (Murant, 1965) в качестве эмульгатора предложил использовать эфир. С помощью этого приема ему удалось получить 100–140 мг вируса из 1 кг материала, т.е. столько же, сколько получал Х. Скотт. Для осветления сока А. Мурант использовал хлороформ, считая этот метод более щадящим.

Результаты испытания методик зарубежных коллег (Murant, 1965; Proll, Richter, 1972; Waterworth, 1975) и нашей модификации показали, что гомогенизацию за-

раженных листьев следует проводить как можно быстрее после их снятия, так как происходит сильное разрушение оболочки вируса. Поэтому надежнее использовать свежесорванные листья, а не хранившийся замороженный материал. В качестве восстанавливающего агента при экстракции обязательно следует добавить 1 %-ный раствор тиогликолевой кислоты и ПЭГ, используемый нами для осаждения.

После двух циклов дифференциального центрифугирования мы получали препарат ВОМ, контроль чистоты препарата проверяли с помощью электронного микроскопа (рис. 27).

### Антигенная характеристика дальневосточного и европейского серотипов ВОМ

Очищенный вирусный препарат использовали как иммуноген для иммунизации животных. Его вводили в/в и в/м кроликам пятикратно (в мышцы задних лапок). Разовая доза иммуногена была 1; 1,5; 2,5; 3,5 и 4,5 мг. На 43-й день после первого цикла иммунизации проводили реиммунизацию – животным вводили 1 мг вируса в/м с адьювантом (4 %-ный раствор альгината натрия фирмы Fluka или адьювант Фрейнда) и АКДС (0,25 мл). Перед иммунизацией поверхностные капсидные белки стабилизировали формалином. Для этого рН смеси (37 % формалина и 12 % этилового спирта) доводили тетраборатом натрия до 7,0. Жидкость наливали в ампулу и на 20 мин помещали на водяную баню, затем охлаждали и добавляли к препарату вируса до 2 %. После чего обработанный формалином иммуноген диализовали в проточной воде в течение ночи. Активность Ас к дальневосточным изолятам повышали путем присоединения антител к белку А стафилококка неинфекционного штамма Cowan 1.

Антисыворотки против изолятов ВОМ из примулы и гладиолуса реагировали со всеми изучаемыми изолятами, а антисыворотки к изолятам ВОМ из смородины и бобов конских не формировали специфический иммунный комплекс с ВОМ (табл. 23).

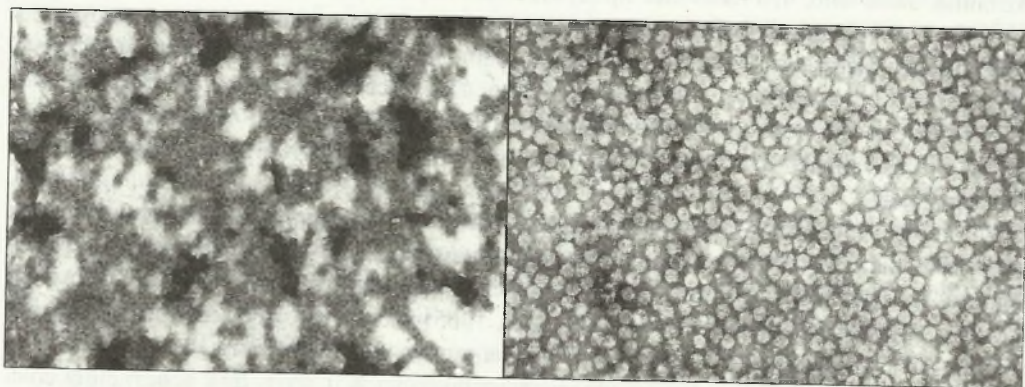


Рис. 27. Электронная микрофотография вирионов вируса огуречной мозаики. Слева – дальневосточный изолят из гладиолуса, увеличение  $\times 90000$ , справа – европейский изолят ВОМ (по: Musil, Richter, 1983), увеличение  $\times 140000$



Результаты капельной агглютинации при выявлении ВОМ

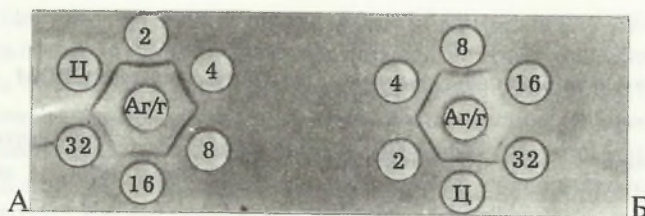
Растение-хозяин	Растение-накопитель вируса	Антисыворотки ВОМ			
		ВОМпр	ВОМгл	ВОМсм	ВОМкб
<i>Ribes niger</i> L., сорт Приморский чемпион	<i>Petunia hybrida</i> hort. <i>N. tabacum</i> L. cv. Samsun	+	+	—	—
<i>Faba bona</i> Medic.	— « —	+	+	—	—
<i>Apium graveolens</i> L.	<i>A. graveolens</i> L.	—	—	—	—
<i>Vigna</i> ssp.	<i>Vigna</i> ssp.	+	+	—	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Ph. vulgaris</i> L.	—	—	—	—
<i>Cucumis sativus</i> L.	<i>C. sativus</i> L.	+	+	—	—
<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>N. tabacum</i> L. cv. Samsun	+	+	—	—
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	— « —	+	+	—	—
<i>Raphanus sativus</i> L. subsp. <i>siensis</i> (Mill.)	<i>R. sativus</i> L. subsp. <i>siensis</i> (Mill.) Sazon	+	+	—	—
<i>Sazon. convar loba</i>	<i>Sazon convar loba</i>	+	+	—	—
<i>Impatiens balsamina</i> L.	<i>N. tabacum</i> L. cv. Samsun	+	+	—	—
<i>Canna indica</i> L.	— « —	+	+	—	—
<i>Echinacea purpurea</i> Moench.	— « —	+	+	—	—
<i>Primula obconica</i> L.	— « —	+	+	—	—
<i>Gladiolus hybridus</i> hort.	— « —	+	+	—	—
<i>N. tabacum</i> L., инфицированный вирусом задержки роста сои	—	—	—	—	—

Примечание. ВОМпр — антисыворотка к изоляту из примулы; ВОМгл — к гладиолусу; ВОМсм — к смородине; ВОМкб — к бобам конским.

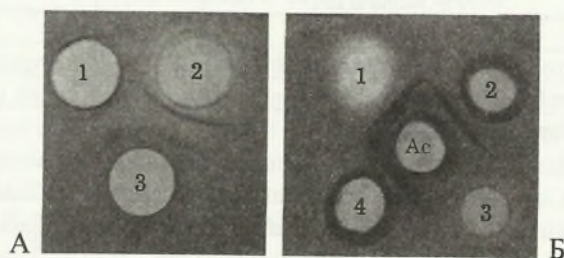
Причем антитела, полученные к изолятам ВОМ из декоративных растений, отличались высокой степенью антигенной активности, большой прочностью связи с гомологичным вирусом, что позволило реакцию антиген-антитело наблюдать в капельной агглютинации. Максимальные титры антисывороток к изоляту ВОМ из примулы в КА были 1:128–1:256, а для изолята ВОМ из гладиолуса 1:1024–1:2048. Однако антисыворотка к изоляту из примулы работала с белками растения-хозяина до разведения 1:4, в то время как антисыворотка к изоляту из гладиолуса была строго специфична.

В РДД антисыворотки к изолятам декоративных культур формировали четкие полосы преципитации с гомологичным вирусом (рис. 28) и имели высокий титр антител — 1:32 (изолят ВОМ из гладиолуса) и невысокий — 1:8 (изолят ВОМ из примулы).

Для определения степени антигенного родства дальневосточных изолятов с европейскими использовались антисыворотки, полученные из Польши, Чехословакии, Германии и Канады. Все дальневосточные изоляты ВОМ имели идентичные эпитопы капсидных белков, поэтому мы отнесли их к дальневосточному серотипу (рис. 29). Антисыворотка к ВОМ, полученная нами от польских коллег, не реагировала с дальневосточными изолятами ВОМ, а немецкая Ас формировала слабые полосы преци-



**Рис. 28.** Титры Ас к изолятам ВОМ из гладиолуса и примулы. В центральных лунках: Аг – инфекционный сок гладиолуса в разведении 1:4 (А) и примулы (Б), в периферических: разведения антисывороток – ц, 1:2, 1:4, 1:8...1:32



**Рис. 29.** Определение антигенного родства между изолятами ВОМ в РДД. А: 1 – изолят из перца, 2 – ВКЗО, 3 – смесь Ас к дальневосточным изолятам ВОМ и к вирусу карликовости земляного ореха. Б: в центре – смесь Ас к дальневосточным изолятам (гладиолус + примула); изоляты ВОМ: 1 – из перца, 2 – из гладиолуса, 4 – из примулы, 3 – сок здорового растения

питании в РДД (к тому же она реагировала с соком здорового растения до разведения 1:4). Это позволило нам сделать вывод, что мы имеем свой, дальневосточный серотип. Антисыворотка, полученная из Канады, была более активной, она выявляла вирус в соке из листьев растений примулы, смородины и огурца.

Антисыворотка от зарубежных коллег против вируса карликовости земляного ореха (ВКЗО), входящего в род кукумовирусов, в РДД показала частичное антигенное родство с дальневосточными изолятами, в то время как среди дальневосточных наблюдалась полная идентичность эпитопов капсидных белков (рис. 30).



**Рис. 30.** Выявление идентичных эпитопов у ВОМ и ВКЗО. В центральных лунках – Ас против ВКЗО, по периферии Аг (изоляты): 1, 14 – из лилии, 2 – из эхинацеи, 3 – томата сорта Ревермун, 4, 16 – бальзамина, 5 – гладиолуса, 6 – канны, 7 – хризантемы, 8 – тюльпана, 9, 11 – тюльпана-II, 10 – нарцисса, 12, 18 – банана, 13, 15, 17 – ВКЗО



Таким образом, дальневосточные изоляты ВОМ из декоративных культур по антигенным и иммуногенным свойствам капсидных белков были отнесены к дальневосточному серотипу. Обычно титры антисывороток, полученные нами к ВОМ, имели показатели 1:64–1:1024. Конечно, были отклонения в ту или иную сторону в зависимости от используемого в работе изолята ВОМ. Активность антисывороток по результатам РДД удалось повысить в реакции антиген–антитело в 100 раз в результате присоединения иммуноглобулина к белку А стафилококка. В эксперименте исходная антисыворотка в реакции виробактериальной агглютинации (ВБА) имела титр 1:32. Ее разводили в 100 раз для приготовления иммунодиагностикума. Минимальная концентрация вируса, выявленная сенсibilизированной антисывороткой, составила 0,7 мкг. Другая антисыворотка с титром 1:128 была разведена в 400 раз и в реакции ВБА выявила 0,3 мкг вируса. На основании этих данных считаем, что для точной и быстрой диагностики может быть применена к ВОМ антисыворотка, сенсibilизированная белком А стафилококка, а для изучения антигенных взаимоотношений изолятов ВОМ лучше применять РДД.

Дальневосточные изоляты ВОМ по биологическим свойствам были разделены на две подгруппы – некротические и обычные ВОМ–U (-С и серотип DTL). К первой отнесли изоляты ВОМ из растений банана, эхинацеи (ВОМ–N). Ко второй подгруппе – все остальные: из растений лилии, примулы, тюльпана, томата, канны, нарцисса, гладиолуса, перца, картофеля, кабачка, бальзамина, смородины (Крылов, 1992; Гнутова, Толкач, 2001).

В Приморском крае в последние годы впервые идентифицированы изоляты ВОМ на комнатных и однолетних растениях: фатсхедере Литца, фикусе Бенджамина, петунии гибридной, львином зеве и мальве, а также на тюльпане, циннии, георгине и орхидеях – катлеи, фаленопсисе, камбии (Толкач, Гнутова, 2007).

Изоляты ВОМ из петунии гибридной *Petunia hybrida* (ВОМп) из семейства *Solanaceae*, львиного зева *Antirrhinum majus* (ВОМлз) из семейства *Scrophulariaceae* и мальвы *Althea rosea* (ВОМм) из семейства *Malvaceae*. Однолетние декоративные растения, выявленные нами во время фитосанитарного мониторинга в различных районах Приморского края, имели следующие вирусоподобные симптомы: львиный зев – хлоротичную пятнистость и сужение листьев (частное хозяйство); петуния гибридная (растение было обнаружено в коллекции декоративных культур на Приморской овощной опытной станции (г. Артем) – вздутие листьев, чередование светло- и темно-зеленых участков ткани листовой пластинки и стягивание главной жилки листа (рис. 31); мальва – яркую кольцевую мозаику (растение росло вблизи коллекционного участка овощных культур Приморского НИИСХ в Уссурийском районе).

Род Антирринум *Antirrhinum* sp. из семейства Норичниковые *Scrophulariaceae* насчитывает 32 вида, но в цветоводстве широкое распространение получил только один – антирринум большой или львиный зев *A. majus* L. (Тельпуховская, 1991). На родине в Южной Европе и Северной Африке это многолетнее растение, но в наших условиях открытого грунта оно выращивается как однолетнее. Львиный зев – один из лучших однолетников, имеющий обильное и продолжительное цветение, разнообраз-



Рис. 31. Мозаика и деформация листьев (А) и мозаичная окраска цветка петунии (Б), вызванные поражением вирусом огуречной мозаики

ные окраски цветов делают его незаменимым растением для цветочного оформления клумб, бордюров и балконов. Высокие сорта львиного зева выращиваются на срезку, так как эти растения в букетах могут стоять более 10 дней. Данных о вирусных заболеваниях львиного зева нами в литературе не найдено, хотя экспериментальным путем этот вид растений заражается многими вирусами, особенно вирусами, выделенными из бобовых культур, например штриховатостью гороха *Pea streak carlavirus*, увяданием бобов *Broad bean wild fabavirus* (Brunt et al., 1997 c, 1997 d).

Петуния гибридная *Petunia hybrida* из семейства Пасленовые *Solanaceae* – это садовый гибрид петунии пазушной *P. axillaris* и петунии фиолетовой *P. violacea*. Растение известно как многолетник, но в садовой культуре выращивается как однолетник. Продолжительное и обильное цветение, устойчивость к заморозкам, яркие окраски обеспечили этому растению самое разностороннее применение в озеленении. А по разнообразию сортов ее можно поставить рядом с астрой или львиным зевом. Петуния гибридная широко применяется для создания групп, бордюров, пятен на газонах, в альпинариях и как горшечная культура. В настоящее время известно порядка 10 вирусов растений, поражающих петунию. К ним относятся: кольцевая пятнистость табака *Tobacco ringspot nepovirus*, кустистая карликовость томата *Tomato bushy stunt tombusvirus*, огуречная мозаика *Cucumber mosaic cucumovirus*, крапчатость петунии *Petunia flower mottle potyvirus*, посветление жилок петунии *Petunia vein clearing caulimovirus*, X-вирус картофеля *Potato X potexvirus*, табачная мозаика *Tobacco mosaic tobamovirus*, звездчатая мозаика петунии *Petunia asteroid mosaic tombusvirus*, итальянский латентный вирус артишока *Artichoke Italian latent nepovirus* и Y-вирус картофеля *Potato Y potyvirus* (Feldhoff et al., 1998; Навалинскене, Самуйтене, 1999; Fauguet, Mayo, 1999).

Мальва или штокроза *Althea rosea* из семейства Мальвовые *Malvaceae* в последнее время пользуется огромной популярностью среди цветоводов для оформления садовых участков. Особый интерес вызывают махровые формы этого вида растения.



Небольшие группы из мальвы на газоне, рабатки вдоль стен и заборов очень эффективны. На мальве наиболее часто встречаются вирусы: прижилковый некроз мальвы *Malva vein necrosis potexvirus*, посветление жилок мальвы *Malva vein clearing potyvirus* и огуречная мозаика (Fauguet, Mayo, 1999; Brunt et al., 1997 c).

Для механической инокуляции использовались листья растений, зараженных исследуемым вирусом, которые растирались в ступке с раствором 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,2. Полученной суспензией обрабатывали поверхность листьев. Фиксировали дату появления первых признаков поражения и описывали развитие симптомов заболевания. При отсутствии явных признаков поражения проводилась проверка на инфекционность путем обратной инокуляции тест-растений, четко реагирующих на изучаемый вирус. В качестве переносчика вируса использовали тлю персиковую *M. persicae* Sulz. Размножали ее на молодых растениях дурмана обыкновенного и бобов конских. Для того чтобы убедиться в стерильности тлей, их переносили на здоровые растения дурмана и бобов, которые потом проверяли на наличие вирусной инфекции на тест-растениях. Передачу вируса тлями определяли визуально по появлению симптомов, а затем проверяли на тест-растениях.

Иммунодиагностику проводили с помощью специфической антисыворотки, полученной нами ранее к изоляту ВОМ, идентифицированному из растений огурца. В РДД использовали 1 %-ный бакто-агар в 0,15 М растворе хлористого натрия с добавлением 1,5 % ПЭГ (м.м. 6000). Положительный результат свидетельствовал о наличии ВОМ в больных растениях петунии, мальвы и львиного зева.

Методом электронной микроскопии в препаратах, приготовленных из растений табака cv. Samsun, зараженного соком растений петунии, мальвы и львиного зева, были обнаружены сферические частицы, диаметр которых порядка 29–30 нм. Результаты по морфологии и размерам вирионов соответствовали данным для ВОМ, описанным в литературе, и подтверждали данные иммунодиагностики (Brunt et al., 1997 a).

На основании полученных результатов был сделан предварительный вывод о том, что в исходных образцах петунии, мальвы и львиного зева присутствует ВОМ. Для отнесения исследуемых изолятов ВОМ к определенной группе штаммов изучали их биологические свойства. Мы уже упоминали, что популяция ВОМ генетически неоднородна, но некоторые штаммы довольно тесно связаны и близки по своим свойствам, поэтому их можно отнести к одной группе штаммов.

Параллельно при изучении круга растений-хозяев изолятов ВОМ испытывали на вирусоустойчивость различные сорта овощных культур (огурцов, томатов, баклажанов, тыквы, перца сладкого), которые обычно выращиваются в Приморском крае. Известно, что число чувствительных к ВОМ растений необычайно велико. Штаммы и изоляты ВОМ отличаются друг от друга по симптомам заболевания на растениях разных видов (Brunt et al., 1997 a). Для сравнительной характеристики биологических свойств исследуемых изолятов ВОМ механическим путем были заражены растения 56 видов и сортов из 9 семейств: *Aizoaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae* (табл. 24).

Реакция тест-растений на заражение изолятами вируса огуречной мозаики, выделенными из петунии, мальвы и львиного зева

Тест-растения	BOM		
	Петуния	Мальва	Львиный зев
<i>Antirrhinum majus</i>	S: Stu, Dis, RM	S: Stu, Dis, Roll	S: Cl, Dis, Stu
<i>Apium graveolens</i> , сорт Паскаль	—	—	—
<i>Callistephus chinensis</i>	—	—	—
<i>Cucumis sativus</i> , сорта:			
Турниф	—	S: GrMot	—
ДВ-6	—	S: CIMot, ClVe	—
Восток	—	S: CIMot	—
Каскад	S: CIM	—	—
ДВ-27	—	S: CIMot	—
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L: N	—	—
<i>Capsicum annuum</i> , сорт Богатырь	S: Cl, DisVe	S: Cl, DisVe, Stu	S: DisVe, CIMot
<i>Cucurbita maxima</i> , сорт Ананасная	—	S: ClVe, Cl	S: ClVe
<i>C. melo</i>	S: ClVe, Roll	S: CIMot	—
<i>Datura stramonium</i>	S: RM	S: ClSp, ClSp, Dis	S: ClVe, GrM, Dis
<i>Impatiens balsamina</i>	—	—	—
<i>Faba bona</i>	L: N	—	—
<i>Gailardia cristata</i>	—	—	—
<i>Lactuca sativa</i> , сорт Лолло-Россо	—	—	—
<i>Lycopersicon esculentum</i> , сорта:			
Союз-8	—	—	—
Отличник	S: Cl, Roll	—	—
Манимейкер	—	S: CIMot, Dis	S: Dis
Моравское чудо	S: ClVe, CIMot	—	—
Пирсон	S: Cl	—	—
Оранжевые сливки	S: CIMot, Roll	—	—
Волгоградский	—	—	—
Белый налив	S: Dis	—	—
Одиссей	—	—	—
Новичок	S: O	S: GrM	—
Невский	—	—	—
Дар Заволжья	S: O	—	—
Перцевидный розовый	S: Dis	—	—
Марманде	S: Dis, GrM	—	—
Хурма	S: M, Dis, Stu	S: GrMot, Dis, Roll	—
Рома	S: O	—	—
Титан	—	—	—
Хабар-308	—	—	—
Черный принц	—	S: ClVe, CIMot, Roll	—



Тест-растения	ВОМ		
	Петуния	Мальва	Львиный зев
<i>Nicotiana tabacum</i> , cvs:			
Samsun	S: ClM, Dis	S: Cl, Dis, ClMot	S: ClVe, ClSp
Xanthi	S: ClVe, Cl	S: Cl, Dis, ClMot	S: ClBdVe
<i>N. alata</i>	S: ClMot	S: ClVe, Stu, Dis,	S: ClMot
<i>N. rustica</i>	S: Cl, Dis	S: ClMot	S: ClMot, ClSp
<i>N. paniculata</i>	–	–	–
<i>N. glutinosa</i>	S: ClMot, Dis	S: Dis, Stu, GrM	S: Stu, Dis, GrMot
<i>Nicandra physaloides</i>	S: Stu, ClMot, Cl	S: Stu, Cl	S: Cl, DisVe, ClVe
<i>Petunia hybrida</i>	S: GrM, Dis, ClMot	S: ClVe, DisVe	S: Dis, Cl
<i>Physalis pubescens</i>	S: ClVe, GrM, Dis	–	–
<i>Ph. floridana</i> , сорт Кондитерский	–	–	–
<i>Phaseolus vulgaris</i>	–	–	–
<i>Ph. Mungo</i>	S: GrMot, Dis	–	–
<i>Spinacia oleracea</i> , сорт Малина	–	SClVe, Dis, DisVe	S: O
<i>Solanum melongena</i> , сорт Черный красавец	–	–	–
<i>Tagetes erecta</i>	–	–	–
<i>Tetragonia expansa</i>	–	–	–
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	–	–	–
<i>Zinnia elegans</i> , сорт Новый аттракцион	S: ClMot, Dis	S: ClMot, DisVe	S: ClMot
<i>Vigna unquiculata</i>	S: Dis, ClMot	–	–
<i>Vigna sinensis</i>	–	S: GrMot, DisVe	–

Примечание. Прочерк означает – не заражается.

Как свидетельствуют данные табл. 24, разные виды растений специфически реагировали на заражение изолятами. Изолят ВОМп экспериментально заразил растения 29 видов и сортов; ВОМм – 23, а ВОМлз – 14. Это показывает, что восприимчивость тест-растений на заражение изучаемыми изолятами ВОМ различна. Не одинаковыми были и симптомы проявления вирусной инфекции при инфицировании одних и тех же растений этими изолятами. Растения *N. tabacum* cv. Samsun на инфицирование ВОМп реагировали системной хлоротичной мозаикой и слабой деформацией, тогда как реакция на заражение ВОМм проявлялась в виде яркого хлороза всех листьев растений, суровой деформацией, а также хлоротичной крапчатостью. ВОМлз вызывал у растений этого вида табака хлороз всех жилок листа и хлоротичную пятнистость, разбросанную по всей пластинке листа. При заражении *N. tabacum* cv. Xanthi ВОМп у растений проявился яркий хлороз жилок на фоне общего хлороза листьев, в то время как на заражение ВОМм и ВОМлз они реагировали хлорозом листьев, деформацией, хлоротичной крапчатостью и хлоротичным окаймлением жилок листа. Растения

табака душистого *N. alata* на инфицирование ВОМп и ВОМлз одинаково проявляли симптомы хлоротичной крапчатости, а ВОМм вызывал у растений кроме хлороза жилков деформацию и задержку роста растений. По-разному реагировали на заражение изолятами и растения махорки *N. rustica*. Системная хлоротичная крапчатость наблюдалась у растений при инфицировании ВОМм и ВОМлз лишь в том случае, если при заражении последним изолятом кроме крапчатости на 10–12 день после инокуляции появлялась яркая хлоротичная пятнистость. ВОМп вызывал на растениях общий хлороз и деформацию листьев. Только табак метельчатый *N. paniculata* оказался устойчивым на заражение всеми изолятами ВОМ.

Однако изучаемые изоляты имели индивидуальные особенности. Так, ВОМп был единственным из трех изолятов, который заражал растения мари амарантоцветной *Ch. amaranticolor*, бобы конские *Faba bona*, физалис земляничный *Physalis pubescens*, фасоль урд *Phaseolus mungo* и вигну початковую *Vigna unguiculata*. При этом изолят ВОМм инфицировал растения шпината огородного *Spinacea oleracea* сорта Малина и вигну китайскую *V. sinensis*. К ВОМм и ВОМлз эти растения являлись устойчивыми.

Проверка некоторых сортов овощных культур на устойчивость к заражению исследуемыми изолятами ВОМ также выявила различия между ними. В эксперименте были использованы растения 19 сортов томата съедобного *L. esculentum*. Восприимчивыми к изоляту ВОМп оказалось 11 сортов, причем такие сорта, как Новичок, Рома и Дар Заволжья, заражались без проявления внешних симптомов, т. е. латентно. ВОМм заразил всего 4 сорта томата: Манмейкер, Новичок, Хурма и Черный принц. Остальные сорта были устойчивыми к изучаемому изоляту. К ВОМлз в проведенном нами опыте восприимчивым оказался только один сорт томата – Манмейкер, который прореагировал на заражение лишь деформацией листьев.

Разницу между изучаемыми изолятами ВОМ наблюдали и при инфицировании растений 5 сортов огурца посевного *C. sativus*. ВОМп заразил только растения огурца сорта Каскад, а к изоляту ВОМм этот сорт оказался устойчивым, у остальных сортов: ДВ-6, Восток, Турниф и ДВ-27 на 5–7 день после инокуляции появлялась системная зеленая или хлоротичная крапчатость листьев. ВОМлз в эксперименте не заразил растения ни одного сорта огурца.

При изучении круга растений-хозяев исследуемых изолятов инокулировали и декоративные виды растений: львиный зев *Antirrhinum majus*, недотрогу бальзаминную, или бальзамин, *Impatiens balsamina*, астру китайскую *Callistephus chinensis*, петунию *Petunia hybrida*, тагетес прямостоящий *Tagetes erecta*, гайардию остистую *Gailardia cristata* и циннию изящную *Zinnia elegans*. Изолятами ВОМ удалось заразить только львиный зев, циннию элегантную и петунию гибридную. Остальные 4 вида цветочных растений являлись устойчивыми к заражению.

ВОМп, ВОМм и ВОМлз не инфицировали растения: сельдерей пахучий сорта Паскаль *Apium graveolens*; салат посевной сорта Лолло-Роско *Lactuca sativa*; томаты сортов Союз-8, Волгоградский, Одиссей, Невский, Титан и Хабар-308; физалис флоридский *Physalis floridana*; фасоль обыкновенную *Ph. vulgaris*; баклажан сорта Черный красавец *Solanum melongena*; шпинат новозеландский *Tetragonia expansa*; пажитник сенной *Trigonella foenum-graecum*.



Итак, нами показано, что изучаемые изоляты легко передавались механически и с помощью тли персиковой *M. persicae*. Данные способы передачи очень характерны для этого вируса. На основании полученных данных по изучению экспериментального круга растений-хозяев и симптоматологии можно сделать вывод о существенных различиях между изолятами, что свидетельствует о видовом разнообразии ВОМ. Однако в целом симптоматика на тест-растениях не особо отличалась от той, которую вызывает обычный штамм ВОМ, описанный в литературе (Brunt et al., 1997 а).

Одним из важных моментов в циркуляции вирусов растений в природе является их передача семенами зараженных растений. Для изучения этого способа передачи исследуемых изолятов ВОМ было проверено 20 семян растения никандры физалисовидной *Nicandra physaloides*, 40 петунии гибридной и 20 перца однолетнего сорта Богатырь, зараженных ВОМп; ВОМм – 26 семян томата сортов Манмейкер, 15 сорта Хурма и 31 сорта Новичок и ВОМлз – 90 семян дурмана обыкновенного. Ни у одного из полученного из семян больных растений сеянца не наблюдали симптомов вирусного поражения. По истечении 1 мес. эти растения были проверены на наличие вирусной инфекции путем инокуляции верхних листьев этих растений, поскольку они считаются наиболее чувствительными к заражению изучаемыми изолятами ВОМ. Симптомов в течение всего эксперимента не наблюдали. На основании этих результатов мы делаем вывод, что изоляты ВОМп, ВОМм и ВОМлз семенами зараженных растений не передаются. Это согласуется с литературными данными, в которых есть сведения, что семенами могут передаваться только бобовые штаммы ВОМ, но не штаммы обычной группы (Поливанова, Крылов, 1985). Эти результаты свидетельствовали в пользу того, что изучаемые изоляты можно отнести к группе-I ВОМ.

Изучен другой важный критерий идентификации вирусов растений – физические свойства вирионов (табл. 25).

Таблица 25

Физические свойства дальневосточных изолятов ВОМ, выявленных на декоративных растениях

Изоляты	ТТИ, °С	ПСИ, сут	ПРС
Петуния	65–70	3	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
Мальва	75–80	5	$10^{-2}$ – $10^{-3}$
Львиный зев	55–60	2	$10^{-1}$ – $10^{-2}$
Бальзамин*	65–70	3–7	–
Гладиолус*	65–70	3–4	–
Дельфиниум*	65–70	3–4	–
Канна*	67–68	3–4	–
Эхинацея*	66–67	3–4	–
Примула*	65–70	3–5	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
ВОМ**	55–70	1–10	$10^{-3}$ – $10^{-4}$

\*По: А.В. Крылов, 1992. \*\*По: Brunt et al., 1997.

Из изучаемых изолятов самым устойчивым оказался ВОМм. Он сохранял инфекционность в течение 5 сут и выдерживал прогревание при температуре 75–80 °С. Разведение вируса в инфекционном соке составляло  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ . ВОМлз, наоборот, имел ТТИ более низкую – 55–60 °С и сохранялся в комнатных условиях в течение 2 сут. ПРС составляло  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , что соответствует показателям для обычного штамма ВОМ (Гнутова, 1985). Эти данные для ВОМп практически не отличались от результатов, полученных ранее для изолятов ВОМ из других декоративных растений: бальзамина, гладиолуса, дельфиниума, канны, примулы и эхинацеи. ТТИ у этих изолятов находилась в пределах 65–70 °С, ПСИ от 3–5 сут (Крылов, 1992).

Таким образом, из однолетних цветочных растений, выращиваемых в открытом грунте, ВОМ идентифицирован на львином зеве, петунии гибридной и мальве, относящимся к семействам *Scrophulariaceae*, *Solanaceae* и *Malvaceae*. Результаты изучения физических свойств изолятов близки, но не одинаковы. Однако они соответствуют литературным данным и показателям, полученным ранее к изолятам, выявленным на декоративных культурах, которые были отнесены к обычной группе штаммов ВОМ. Впервые показано, что растения львиного зева могут инфицироваться ВОМ. Эти данные расширили список декоративных растений, поражаемых этим вирусом.

*Изоляты ВОМ из фатсхедеры Литца и фикуса Бенджамина.* В настоящее время комнатные растения фатсхедера Литца *Fatshedera litzei* Guill. из семейства Аралиевые *Araliaceae* и фикус Бенджамина *Ficus benjamina* L. из семейства Тутовые *Moraceae* завоевали большую популярность и широкое распространение как среди цветоводов-любителей, так и у дизайнеров для озеленения жилых и административных помещений, при создании зимних садов.

Фатсхедера Литца – неприхотливый межродовой гибрид, полученный в начале XX века во Франции в результате скрещивания растений плюща обыкновенного и фатсии японской (Хессайон, 2004). Это необычно стойкая вечнозеленая комнатная лиана, не требующая много света. Фикусы из всех представителей растений семейства тутовых благодаря многообразию декоративных видов и форм уже долгие годы пользуются популярностью среди цветоводов-любителей и дизайнеров. Эти растения с блестящей листвой, быстро вегетирующие, вечнозеленые, терпимо относящиеся к сухому воздуху закрытых помещений, прекрасно растущие даже в слабо освещенных условиях, стали необычайно популярными и довольно широко используются сегодня. В последнее время из них очень часто делают зеленые скульптуры (Чуб, 2000).

Однако у растений фатсхедеры и фикуса существуют многочисленные вредители (клещи, щитовки, мучнистый червец, корневой жук), кроме того, они подвержены различным бактериальным, грибным и вирусным заболеваниям. Размножаются эти виды растений вегетативно, поэтому, как и многие другие растения, размножающиеся подобным путем, могут передавать вирусную инфекцию непосредственно своему потомству. Существующая прямая опасность распространения среди декоративных культур вирусов растений в настоящее время весьма актуальна. По нашим наблюдениям, поражение вирусами растений многих декоративных культур в последнее время постоянно возрастает. Особую опасность вирусная инфекция имеет для декоратив-



ных растений, выращиваемых в ботанических садах, где собран их богатый генофонд. При этом ежегодно между большинством ботанических садов мира происходит взаимобмен растительным материалом, поэтому постоянный фитосанитарный контроль за уникальным коллекционным материалом имеет важное значение. На основании выявленного состава вирусов растений можно разрабатывать меры защиты, которые позволят не давать возможность дальнейшего распространения вирусной инфекции на здоровые растения.

Растение фатсхедеры Литца с симптомами светло-зеленой мозаики и деформации получено нами из коллекции Ботанического сада-института ДВО РАН (г. Владивосток), а фикус Бенджамина с симптомами кольцевой мозаики предоставлен цветоводом-любителем. При идентификации вирусного патогена соком больных растений фикуса и фатсхедеры был инфицирован табак *св. Xanthi*. Симптомы поражения, вызываемые на нем обоими изолятами, были сходны с симптомами, которые обычно вызывает ВОМ. Однако изолят из фатсхедеры на табаке вызывал более суровые симптомы: на первых стадиях заражения – зеленую крапчатость, позже – общий хлороз растения, хлороз жилок, деформацию листьев; в то же время на изолят из фикуса растение реагировало только хлорозом жилок. Для подтверждения вирусной этиологии заболевания была использована специфическая антисыворотка, приготовленная нами ранее к изоляту ВОМ из огурца. С ее помощью в РДД изучена и установлена степень антигенного родства исследуемых декоративных изолятов ВОМ. Была получена положительная реакция между антисывороткой и изолятами вируса, присутствующими в свежем инфекционном соке из растений фикуса и фатсхедеры. Причем сформировавшиеся полосы преципитации были полностью идентичны. С белками здоровых растений антисыворотка не реагировала, что свидетельствовало о ее строгой специфичности. Анализ антигенных взаимоотношений исследуемых изолятов ВОМ, проведенный с помощью РДД, показал, что на поверхности КБ изучаемых вирусных изолятов располагаются идентичные эпитопы. Это позволяет сделать вывод о том, что декоративные культуры фикус и фатсхедера поражаются одним и тем же вирусом, который ранее был отнесен нами к группе обычных штаммов ВОМ. Эти результаты соответствуют полученным нами ранее данным по определению антигенного родства изолятов, выявленных на других декоративных и овощных культурах (Гнутова и др., 1985; Чернявская и др., 2002).

В электронном микроскопе в препаратах, приготовленных из сока *N. tabacum св. Xanthi*, инфицированного изучаемыми изолятами ВОМ, были выявлены вирусные частицы сферической формы диаметром около 30 нм, что соответствовало литературным данным (Brunt et al., 1997).

Вирусные изоляты легко передавались с больного растения *N. tabacum св. Xanthi* на здоровое тлей *M. persicae*, что также характерно для ВОМ. Поэтому полученные нами результаты позволяли считать, что оба вирусных изолята являются ВОМ. Для убедительности сделанного нами вывода необходимо было изучить круг поражаемых растений, так как только специфические симптомы проявления вирусной инфекции на определенных видах растений могли служить веским доказательством в пользу этого вируса.

Тест-растения	ВОМ из фикуса	ВОМ из фатгсхедеры
<i>Nicotiana tabacum</i> , cvs.: Samsun Xanthi	L: ClSp, S: ClVe, ClRM, Dis S: ClVe	S: ClVe S: ClVe, Cl, GrMot, Dis
<i>N. alata</i>	S: ClVe, ClMot	S: ClVe, M
<i>N. fruticosa</i>	—	—
<i>N. paniculata</i>	S: GrBdVe	—
<i>N. glutinosa</i>	S: ClMot, Dis	S: Cl, ClVe, GrM
<i>Nicandra physaloides</i>	S: ClMot, Stu, Dis	S: ClVe, Cl, Dis
<i>Petunia hybrida</i>	S: ClVe, ClMot, Dis	S: GrM
<i>Physalis pubescens</i>	—	—
<i>Ph. floridana</i> , сорт Кондитерский	—	S: Cl, Dis
<i>Phaseolus vulgaris</i>	—	—
<i>Ph. mungo</i>	—	—
<i>Spinacia oleracea</i> , сорт Малина	—	—
<i>Solanum melongena</i> , сорта: Фиолетовое чудо Черный красавец	— —	— S: Cl, GrSp
<i>Tagetes erecta</i>	S: ClVe, ClMot	—
<i>Tetragonia expansa</i>	—	—
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	—	—
<i>Zinnia elegans</i> , сорт Новый аттракцион	S: ClMot, Dis	—
<i>Vigna unguiculata</i>	—	—
<i>Vigna sinensis</i>	L: NR	—

Примечание. Прочерк означает – растение не заражается.

Сходные симптомы на заражение вирусными изолятами наблюдались только у двух растений: у табака душистого *N. alata* – системный хлороз жилок и хлоротичная мозаика листьев, у салата посевного *Lactuca sativa* сорта Лолло-Россо – бессимптомное поражение растения.

Хотелось отметить, что ВОМфик заражал больше тест-растений по сравнению с ВОМфат. Так, ВОМфик заражал дурман индийский *Datura innoxia*; *L. esculentum* сортов Оранжевые сливки, Марманде, Хурма, Хабар-308; табак метельчатый *N. paniculata*; бархатцы прямостоячие *Tagetes erecta*; циннию изящную *Zinnia elegans* и вигну китайскую *Vigna sinensis*, тогда как эти растения были устойчивыми к инфицированию их ВОМфат. Однако экспериментальное инфицирование показало, что отдельные виды растений поражались только ВОМфат. Это белена черная *Hyoscyamus niger*; *L. esculentum* сортов Манмейкер, Невский, Рома; махорка *N. rustica*; физалис флоридский *Physalis floridana* сорта Кондитерский и баклажан *Solanum melongena* сорта Черный красавец.

Физические свойства для ВОМфат и ВОМфик были очень близки – ТТИ составляло 55–60 °С; ПРС – 4 сут. Показатель ПРС немного различался: у ВОМфик



составлял  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , а у ВОМфат –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . Для обычного штамма ВОМ физические свойства были в пределах: ТТИ – 55–70 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – 1–10 сут (Brunt et al., 1997). Итак, полученные нами результаты по изучению физических свойств изолятов ВОМ, выявленных на декоративных растениях, и литературные данные согласуются. Анализ результатов изучения физических свойств изолятов ВОМ, обнаруженных ранее на бальзамине, гладиолусе, дельфиниуме, канне, эхинацее и примуле в ДФО, показал, что они были более устойчивыми, так как ТТИ у всех превышала 65 °С, хотя ПСИ был не более 4 сут (исключение составлял изолят из бальзамина – ПСИ до 7 сут) (табл. 27).

Таблица 27

Физические свойства приморских изолятов ВОМ,  
обнаруженных на декоративных культурах

Изоляты	ТТИ, °С	ПСИ, сут	ПРС
Каттлея	55–60	4	$10^{-5}$ – $10^{-6}$
Фаленопсис	75–80	4	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
Камбрия	45–50	около суток	$10^{-1}$ – $10^{-2}$
Петуния	65–70	3	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
Тюльпан	50–55	около суток	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
Мальва	75–80	1	$10^{-2}$ – $10^{-3}$
Георгин	65–70	5	$10^{-1}$ – $10^{-2}$
Львиный зев	55–60	2	$10^{-1}$ – $10^{-2}$
Бальзамин*	65–70	3–7	–
Гладиолус*	65–70	3–4	–
Дельфиниум*	65–70	3–4	–
Канна*	67–68	3–4	–
Эхинация*	66–67	3–4	–
Примула*	65–70	3–5	$10^{-3}$ – $10^{-4}$
ВОМ**	55–70	1–10	$10^{-3}$ – $10^{-4}$

\* Данные по: А.В. Крылов, 1992. \*\* Данные по: Description, 1997.

Итак, впервые в ДФО на декоративных растениях фатсхедеры Литца (семейство *Araliaceae*) и фикуса Бенджамина (семейство *Moraceae*) идентифицирован ВОМ.

*Изоляты ВОМ, поражающие орхидеи.* Цветочные растения семейства *Orchidaceae* родов *каттлея* *Cattleya* sp., *камбрия* *Cambria* sp. и *фаленопсиса* *Phalenopsis* sp. с вирусоподобными симптомами были переданы для изучения дальневосточными цветоводами-любителями из частных коллекций. На растениях были отмечены симптомы: на каттлее – посветление жилок листьев, на фаленопсисе – хлоротичная штриховатость листьев, на камбрии – деформация листьев и карликовость растения.

Орхидные, или ятрышниковые, (семейство *Orchidaceae*) – одно из самых многочисленных семейств цветочных растений, включающих более 25000 природных видов и около 100000 искусственно полученных гибридов (Орхидеи, 2002). В настоящее время орхидеи стали обычными растениями, выращиваемыми в комнатных условиях

и оранжереях. Орхидеи отличаются от многих других цветочных растений прежде всего своими удивительными и прекрасными цветками. Без них эти растения не представляют декоративной ценности. Виды растений семейства *Orchidaceae* пользуются огромной популярностью у цветоводов-любителей. Отдельные растения из этого семейства, например фаленопсис, не требуют особого ухода, поэтому имеют широкое распространение. Цветущие орхидеи на современном рынке стоят немалые деньги, так как на выращивание одного растения уходит от 5 до 10 лет, поэтому особое внимание уделяется выращиванию здоровых растений.

У орхидей очень много вредителей (улитки, насекомые), к тому же они довольно часто поражаются грибными, бактериальными и вирусными заболеваниями. Распространение вирусной инфекции, чаще всего ВОМ, происходит с помощью насекомых-переносчиков. Главными из них являются тли, основные виды – *Aphis gossypii* и *M. persicae*. Кроме того, вирус легко передается механически (во время ухода за растениями и при срезке цветов), но через почву вирус не передается (Pares, Gunn, 1989).

Для выявления вируса в РДД была использована антисыворотка против огуречного изолята ВОМ. Положительный результат показывал о присутствии в больных цветочных растениях этого вируса. Кроме того, исследуемые изоляты ВОМ в РДД формировали идентичные полосы преципитации, что указывало о наличии идентичных эпитопов капсидных белков у всех изолятов и подтверждало их близкое антигенное родство с вирусом, имеющим распространение на овощных культурах. Это позволило изучаемые нами орхидные изоляты ВОМ, как и изученные нами ранее (Гнутова и др., 1985), отнести к обычной группе штаммов ВОМ дальневосточного серотипа.

В электронном микроскопе в препаратах из растений *N. tabacum* cv. Xanthi, инфицированных соком из изучаемых растений камбрии, фаленопсиса и каттлеи, были выявлены сферические частицы диаметром около 28–30 нм, что соответствовало литературным данным (Brunt et al., 1997).

Все изоляты легко передавались с больного растения на здоровое тлей *M. persicae*, что также характерно для ВОМ.

Дальнейшая идентификация вируса из камбрии (ВОМкам), фаленопсиса (ВОМф) и каттлеи (ВОМкат) заключалась в проведении сравнительной характеристики их биологических свойств, так как круг поражаемых растений и симптоматология являются при изучении вирусов и их изолятов важным диагностическим критерием. В нашем эксперименте изоляты механически передавались на растения 52 видов и сортов, относящихся к семействам: *Aizoaceae*, *Apiaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Balsaminaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*. Изучаемые растения по-разному реагировали на заражение вирусом (табл. 28), но легче всего заражались растения дурмана обыкновенного *D. stramonium*. При этом ВОМкат вызывал на растении системный хлороз жилок, деформацию и хлоротичную пятнистость, ВОМф – системную зеленую крапчатость и деформацию, а ВОМкам – хлоротичную пятнистость и зеленую мозаику. Изоляты ВОМф, ВОМкат и ВОМкам инфицировали табак обыкновенный cvs. Samsun и Xanthi, махорку *N. rustica*, никандру физали-



совидную и петунию гибридную. Растения не одинаково реагировали на заражение. Так, ВОМф и ВОМкам на листьях табака св. *Xanthi* вызывали системный хлороз жилок, деформацию и задержку роста растений, а ВОМкат вызывал у растения только хлоротичную крапчатость. Табак св. *Samsun* реагировал на инфицирование ВОМкат только хлоротичной крапчатостью, а на ВОМф – деформацией, ярким хлорозом жилок, между которыми наблюдалась хлоротичная крапчатость. ВОМкам вызывал у растения табака хлоротичную мозаику. *P. hybrida* реагировала схожими симптомами на инфицирование ВОМф и ВОМкам – хлорозом всех листьев растений, на заражение ВОМкат реакция проявлялась кроме хлороза еще в виде деформации и зеленой крапчатости, иногда задержкой роста растения.

Таблица 28

Реакция тест-растений на заражение изолятами из растений семейства *Orchidaceae*

Тест-растения	Изоляты ВОМ		
	Катгеля	Фаленопсис	Камбрия
<i>Antirrhinum majus</i>	S: Dis, Stu	S: Cl	—
<i>Apium graveolens</i> , сорт Паскаль	—	—	S: Dis, Cl
<i>Balsamin</i> sp.	—	—	—
<i>Callistephus chinensis</i>	—	—	—
<i>Cucumis sativus</i> , сорта: Турниф	—	—	—
ДВ-6	S: ClSp	—	S: ClM, ClVe
Хабар	S: ClMot, Sp	—	—
Каскад	—	—	S: ClVe, ClMot, Dis
ДВ-27	—	—	—
<i>Chenopodium quinoa</i>	—	—	L: N
<i>Capsicum annuum</i> , сорт Богатырь	S: ClMot, DisVe	—	S: ClVe
<i>Cucurbita maxima</i> , сорт Ананасная	—	S: CLMot, ClM	—
<i>C. melo</i>	—	—	—
<i>Datura stramonium</i>	S: ClVe, Dis, ClSp	S: GrMot, Dis	S: ClSp, GrM
<i>D. innoxia</i>	—	—	S: DisVe, Stu, ClMot
<i>Faba bona</i>	—	—	—
<i>Hyoscyamus niger</i>	S: ClMot, Dis	S: ClM, Dis	—
<i>Gomphrena globosa</i>	L: N	—	L: N
<i>Gaillardia aristata</i>	S: GrSp	—	—
<i>Lactuca sativa</i> , сорт Лолло-Россо	—	—	—
<i>Lycopersicon esculentum</i> , сорта:			
Союз-8	—	—	—
Манимейкер	—	—	—
Белый налив	—	—	—
Новичок	—	—	—
Невский	S: Dis	—	—
Дар Заволжья	—	S: ClMot	S: ClMot, Cl

Тест-растения	Изоляты ВОМ		
	Каттлея	Фаленописис	Камбрия
Перцевидный розовый	–	–	S: Dis
Рома	–	–	S: M, Dis,
Титан	–	–	–
Черный принц	–	S: ClVe, Dis	–
<i>Nicotiana tabacum</i> cvs.: Samsun	S: CIMot	S: ClVe, Dis, CIMot	S: CIM
Xanthi	S: CIMot	S: ClVe, Stu, Dis	S: ClVe, CIMot, Dis, Stu
<i>N. alata</i>	S: Dis, CIMot	–	–
<i>N. fruticosa</i>	S: ClVe, Dis	–	S: ClVe
<i>N. rustica</i>	S: Cl, Roll	S: ClVe, Dis	S: Cl, Dis
<i>N. paniculata</i>	–	S: ClVe	–
<i>N. glutinosa</i>	S: GrSp, Dis	S: CIMot, Dis	–
<i>Petunia hybrida</i>	S: Cl, Dis, GrMot, Stu	S: Cl	S: Cl
<i>Nicandra physaloides</i>	S: Dis	S: Dis, M, ClVe	S: CIMot, Dis
<i>Physalis pubescens</i>	–	–	S: Cl
<i>Ph. floridana</i> , сорт Кондитерский	–	–	–
<i>Phaseolus vulgaris</i>	–	–	–
<i>Ph. mungo</i>	–	–	S: DisVe, Cl
<i>Spinacia oleracea</i> , сорт Малина	–	–	–
<i>Solanum melongena</i> , сорта:			
Фиолетовое чудо	–	–	–
Черный красавец	–	–	–
<i>Tagetes erecta</i>	–	–	S: Cl, Mot
<i>Tetragonia expansa</i>	–	–	–
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	L: N	–	–
<i>Zinnia elegans</i> , сорт Новый аттракцион	S: CIM, Cl, Dis	–	–
<i>Vigna unguiculata</i>	–	–	–

Примечание. Прочерк означает – растение не заражается.

Все изоляты вызывали у *N. physaloides* деформацию листьев, но при заражении ВОМф наблюдались мозаика, хлороз жилок, а ВОМкам – хлоротичная крапчатость. ВОМкат и ВОМф системно заражали львиный зев *Antirrhinum majus*, причем ВОМкат вызывал у растения сильную деформацию листьев и задержку роста растения, а ВОМф – слабый хлороз листьев; к заражению ВОМкам это растение было устойчиво. Все изучаемые орхидные изоляты не заражали бальзамин *Balsamin* sp.; астру китайскую *Callistephus chinensis*; огурец посевной *C. sativus* сортов Турниф, ДВ-27; салат посевной *Lactuca sativa* сорта Лолло-Россо; томат съедобный *L. esculentum* сортов Союз-8, Манимейкер, Белый налив, Новичок, Титан; фасоль обыкновенную *Ph. vulgaris*; шпинат *Spinacia oleracea* сорта Малина; баклажан *S. melongena* сортов Фиолетовое чудо, Черный красавец.



Вместе с тем следует отметить, что каждый изучаемый изолят ВОМ имел свои индивидуальные особенности, отличающие его от других изолятов. Так, большинство тест-растений к заражению ВОМф оказались устойчивыми. Из растений 52 видов и сортов ВОМф заразил только 15, тогда как ВОМкат и ВОМкам – 21 и 20 соответственно. Однако ВОМф заражал тыкву крупноплодную *Cucurbita maxima* сорта Ананасная, *L. esculentum* сорта Черный принц, тогда как на ВОМкат и ВОМкам эти растения не отвечали симптомами.

ВОМкат и ВОМкам по сравнению с ВОМф поражали в количественном отношении большее число тест-растений, но при этом симптомы на различных видах и сортах растений, вызываемые этими изолятами, были различные. ВОМкат в отличие от двух других изолятов, инфицировал *C. sativus* сорта Хабар, гайардию остистую *Gaillardia aristata*, гомфрену головчатую *Gomphrena globosa*, *L. esculentum* сорта Невский, табак душистый *N. alata*, пажитник сенной *Tr. foenum-graecum* и циннию изящную *Zinnia elegans*, причем *G. globosa* и *T. foenum-graecum* заражались с образованием локальных некрозов. Особенность ВОМкам заключалась в том, что это единственный из изолятов, который поражал марь квиноа *Ch. quinoa* (локальные некрозы), дурман индийский *D. innoxia*, два вида фасоли – пушистая *Phaseolus pubescens* и урд *Ph. mungo*, томат *L. esculentum* сортов Перцевидный розовый и Рома, бархатцы прямостоящие *Tagetes erecta*.

Что касается семенной передачи, то здесь следует отметить, что изучаемые изоляты ВОМ через семена зараженных растений не передаются. Исключение составляют лишь бобовые штаммы.

Орхидеи *Orchis* spp. в естественной флоре и выращиваемые в комнатных условиях и оранжереях поражают свыше 20 вирусов (Zettler et al., 1990). Одним из первых на растениях этого семейства был обнаружен потексвирус мозаики цимбидиума *Cymbidium mosaic potexvirus*. К настоящему времени известно, что он является и самым распространенным на орхидеях. Причем природными хозяевами вируса являются исключительно орхидеи, поэтому вирус мозаики цимбидиума имеет синоним – мозаики орхидей. Тобамовирус кольцевой пятнистости одонтоглоссума *Odontoglossum ringspot tobamovirus* не менее распространенный на растениях этого семейства, чем вирус мозаики цимбидиума (Pares, Gunn, 1989). Вирус впервые описан в США. Растение-хозяин – *Odontoglossum grande*, *Cymbidium* spp. Нередко вирус мозаики цимбидиума и вирус кольцевой пятнистости одонтоглоссума встречаются в смешанной инфекции и вызывают деформацию и опадение бутонов, изменение длины цветоноса, образование цветочных химер, а на листьях – мозаику, полосатость, пятнистость и штриховатость (Lawson, Branmagan, 1986). Потивирус мозаики дендробиума *Dendrobium mosaic potyvirus* имеет естественные растения-хозяева – *Dendrobium* spp., потивирус мозаики орнитогалума *Ornithogalum mosaic potyvirus*, впервые описанный в США, – *Ornithogalum* spp. и *Lachenaria* spp. и их гибриды, а кластеровирус некроза жилок дендробиума *Dendrobium vein necrosis closterovirus*, впервые идентифицированный в Германии, – *Dendrobium phalenopsis* (Brunt et al., 1997 e).

Природными растениями-хозяевами вирусов из рода *Cytorhabdovirus* являются также разные виды орхидных. Впервые рабдовирус крапчатости орхидей *Orchid*

*fleck rhabdovirus* выявлен в Японии. Синонимы: вирус листовой штриховатости дендробиума *Dendrobium leaf streak virus*; вирус дендробиума *Dendrobium virus*; вирус хлоротичной пятнистости фаленопсиса *Phalenopsis chlorotic spot virus*. Естественными растениями-хозяевами вируса являются орхидеи родов *Coelogyne* spp., *Cymbidium* spp., *Phalenopsis* spp., *Renanthera* spp., *Paphyipedium* spp., *Vanda* spp. (Brunt et al., 1997 e).

Из неспецифических вирусов-полифагов на орхидеях описаны вирусы табачной мозаики, огуречной мозаики, желтой мозаики фасоли, кольцевой пятнистости томатов, мозаики турнепса, мозаики люцерны, мозаики резухи, аспермии томатов и погречковости табака. Эти вирусы выявлены как на декоративных, так и на овощных и кормовых культурах. На Украине, в Крыму и на Карпатах в биоценозах природных ландшафтов, а также в ботанических садах Украины помимо характерных для растений семейства орхидных вирусов мозаики цимбидиума и кольцевой пятнистости одонтоглоссума выявлены вирусы погречковости табака, аспермии томатов, вирус мозаики резухи (Коротеева, Полищук, 2004). При идентификации дальневосточных изолятов вируса из орхидей его нельзя было отнести по изученным свойствам ни к одному из перечисленных выше вирусов.

Итак, сравнительный анализ биологических свойств изучаемых изолятов ВОМ из растений трех видов орхидей показал, что они имеют свои индивидуальные особенности, что отличает их друг от друга, а также и от обычного штамма ВОМ как по кругу растений-хозяев, так и по физическим свойствам вирионов. Нами выявлен самый термоустойчивый изолят ВОМ из фаленопсиса (ТТИ – 75–80 °С). Ни один из ранее изученных дальневосточных изолятов ВОМ из декоративных культур не имел такую высокую ТТИ. Кроме того, идентифицирован оригинальный изолят ВОМ из орхидеи камбрии, который был самым нестабильным по физическим показателям для ВОМ, имея очень низкие значения по ТТИ – 45–50 °С, ПРС –  $10^1$ – $10^2$  и ПСИ – около сут. Результаты физических свойств вирионов, полученные нами для изолята ВОМ из камбрии, к тому же существенно отличались от данных, представленных для этого вируса в литературе. Лишь физические свойства вирионов изолята ВОМ из орхидеи катлеи не имели столь резких отличий от литературных данных. Изучаемые изоляты ВОМ в РДД формировали идентичные полосы преципитации с антителами к огуречному изоляту ВОМ, что свидетельствовало о наличии идентичных видоспецифичных эпитопов капсидных белков у всех дальневосточных изолятов ВОМ, которые относятся к дальневосточному серотипу.

#### Определение групповой и субгрупповой принадлежности приморских изолятов ВОМ

Как упоминалось нами ранее, штаммы ВОМ классифицируются по двум группам на основе обнаруженных различий в последовательности их генома, а также антигенных и биологических свойств. (Rizos, 1994; Lin et al., 2003). Для генотипирования 17 дальневосточных изолятов ВОМ были использованы две пары группоспецифиче-



ских праймеров (ЗАО Сибэнзим) и пара диагностических праймеров (Национальный аграрный университет Украины) (табл. 29).

Таблица 29

Структура диагностических и олигонуклеотидов  
субгруппового типирования VOM

Название олигонуклеотида	Последовательность 5' → 3'	Длина нуклеотида, п.н.	Температура отжига, °С	Субгруппа VOM
VOM 1F	TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC	23	53	Fny
VOM 1R	AACACGGAATCAGACTGGGAG	21	54	
VOM 2F	ATCTCCCAATGCTAGAACC	19	53	Q
VOM 2R	TCGGGAGCATCCGTGAGATAGGA	23	59	
VOM 2bF	TTATGGAATTGAACGTAGGTG	21	49	Диагности- ческие
VOM 2bR	ACAGAAAACCGGAGGGAGA	19	51	

При проведении генотипирования с олигонуклеотидами VOM 1F и VOM 1R из 17 приморских изолятов VOM сигнал присутствовал только у трех – из каттлеи, камбрии и петунии (рис. 32), а с олигонуклеотидами VOM 2F и VOM 2R результат соответствовал расчетному ГБО (на 98 %) и ГБО штамма VOM-Fny (CMV<sub>Fny</sub>, GenDank, D10538). Сравнение между собой секвенограмм этих изолятов VOM выявило, что все они практически не имеют различий между собой и группируются, по нашим данным, в одну субгруппу VOM-Fny, что отражено в построенном филогенетическом древе (рис. 33).

Последовательности приморских изолятов VOM группировались в один генетический кластер с минимальными различиями, что позволяет считать их одним дальневосточным типом VOM (рис. 34). Хотя они и относятся к субгруппе VOM-Fny, но серьезно отличаются как от изолятов этой субгруппы, так и от других зарубежных изолятов, что говорит о том, что на территории Приморского края существует свой вариант VOM, отличный от зарубежных изолятов этого вируса.

В 2008 г. в результате совместной работы с лабораторией молекулярной

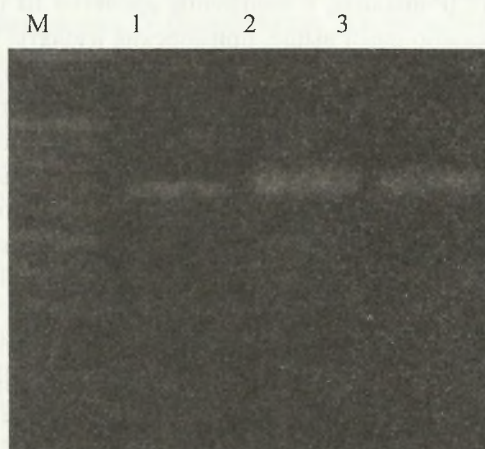


Рис. 32. Электрофореграмма продуктов амплификации с олигонуклеотидами VOM 1F и VOM 1R. М – ДНК маркер 100bp Plus 1,5 Kb Ladder. Изоляты VOM: 1 – из каттлеи, 2 – из петунии, 3 – из камбрии

*fleck rhabdovirus* выявлен в Японии. Синонимы: вирус листовой штриховатости дендробиума *Dendrobium leaf streak virus*; вирус дендробиума *Dendrobium virus*; вирус хлоротичной пятнистости фаленопсиса *Phalenopsis chlorotic spot virus*. Естественными растениями-хозяевами вируса являются орхидеи родов *Coelogyne* spp., *Cymbidium* spp., *Phalenopsis* spp., *Renanthera* spp., *Paphyipedium* spp., *Vanda* spp. (Brunt et al., 1997 e).

Из неспецифических вирусов-полифагов на орхидеях описаны вирусы табачной мозаики, огуречной мозаики, желтой мозаики фасоли, кольцевой пятнистости томатов, мозаики турнепса, мозаики люцерны, мозаики резухи, аспермии томатов и погремковости табака. Эти вирусы выявлены как на декоративных, так и на овощных и кормовых культурах. На Украине, в Крыму и на Карпатах в биоценозах природных ландшафтов, а также в ботанических садах Украины помимо характерных для растений семейства орхидных вирусов мозаики цимбидиума и кольцевой пятнистости одонтоглоссума выявлены вирусы погремковости табака, аспермии томатов, вирус мозаики резухи (Коротеева, Полищук, 2004). При идентификации дальневосточных изолятов вируса из орхидей его нельзя было отнести по изученным свойствам ни к одному из перечисленных выше вирусов.

Итак, сравнительный анализ биологических свойств изучаемых изолятов ВОМ из растений трех видов орхидей показал, что они имеют свои индивидуальные особенности, что отличает их друг от друга, а также и от обычного штамма ВОМ как по кругу растений-хозяев, так и по физическим свойствам вирионов. Нами выявлен самый термоустойчивый изолят ВОМ из фаленопсиса (ТТИ – 75–80 °С). Ни один из ранее изученных дальневосточных изолятов ВОМ из декоративных культур не имел такую высокую ТТИ. Кроме того, идентифицирован оригинальный изолят ВОМ из орхидеи камбрии, который был самым нестабильным по физическим показателям для ВОМ, имея очень низкие значения по ТТИ – 45–50 °С, ПРС –  $10^1$ – $10^2$  и ПСИ – около сут. Результаты физических свойств вирионов, полученные нами для изолята ВОМ из камбрии, к тому же существенно отличались от данных, представленных для этого вируса в литературе. Лишь физические свойства вирионов изолята ВОМ из орхидеи каттлеи не имели столь резких отличий от литературных данных. Изучаемые изоляты ВОМ в РДД формировали идентичные полосы преципитации с антителами к огуречному изоляту ВОМ, что свидетельствовало о наличии идентичных видоспецифичных эпитопов капсидных белков у всех дальневосточных изолятов ВОМ, которые относятся к дальневосточному серотипу.

### Определение групповой и субгрупповой принадлежности приморских изолятов ВОМ

Как упоминалось нами ранее, штаммы ВОМ классифицируются по двум группам на основе обнаруженных различий в последовательности их генома, а также антигенных и биологических свойств. (Rizos, 1994; Lin et al., 2003). Для генотипирования 17 дальневосточных изолятов ВОМ были использованы две пары группоспецифиче-



ских праймеров (ЗАО Сибэнзим) и пара диагностических праймеров (Национальный аграрный университет Украины) (табл. 29).

Таблица 29

Структура диагностических и олигонуклеотидов  
субгруппового типирования ВОМ

Название олигонуклеотида	Последовательность 5' → 3'	Длина нуклеотида, п.н.	Температура отжига, °С	Субгруппа ВОМ
VOM 1F	TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC	23	53	Fny
VOM 1R	AACACGGAATCAGACTGGGAG	21	54	
VOM 2F	ATCTCCCAATGCTAGAACC	19	53	Q
VOM 2R	TCGGGAGCATCCGTGAGATAGGA	23	59	
VOM 2bF	TTATGGAATTGAACGTAGGTG	21	49	Диагности- ческие
VOM 2bR	ACAGAAAACCGGAGGGAGA	19	51	

При проведении генотипирования с олигонуклеотидами VOM 1F и VOM 1R из 17 приморских изолятов ВОМ сигнал присутствовал только у трех – из катглеи, камбри и петунии (рис. 32), а с олигонуклеотидами VOM 2F и VOM 2R результат соответствовал расчетному ГБО (на 98 %) и ГБО штамма VOM-Fny (CMV<sub>Fny</sub>, GenDank, D10538). Сравнение между собой секвенограмм этих изолятов ВОМ выявило, что все они практически не имеют различий между собой и группируются, по нашим данным, в одну субгруппу VOM-Fny, что отражено в построенном филогенетическом древе (рис. 33).

Последовательности приморских изолятов ВОМ группировались в один генетический кластер с минимальными различиями, что позволяет считать их одним дальневосточным типом ВОМ (рис. 34). Хотя они и относятся к субгруппе VOM-Fny, но серьезно отличаются как от изолятов этой субгруппы, так и от других зарубежных изолятов, что говорит о том, что на территории Приморского края существует свой вариант ВОМ, отличный от зарубежных изолятов этого вируса.

В 2008 г. в результате совместной работы с лабораторией молекулярной

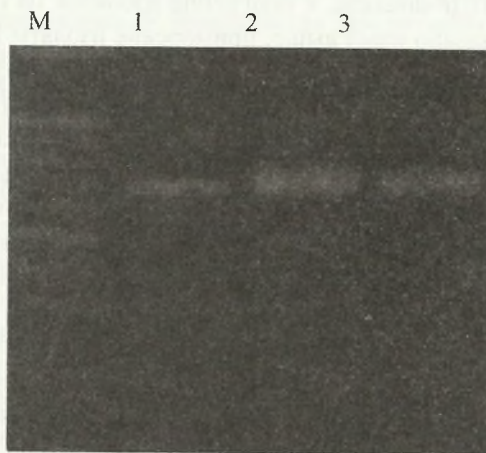


Рис. 32. Электрофореграмма продуктов амплификации с олигонуклеотидами VOM 1F и VOM 1R. М – ДНК маркер 100bp Plus 1,5 Kb Ladder. Изоляты ВОМ: 1 – из катглеи, 2 – из петунии, 3 – из камбри

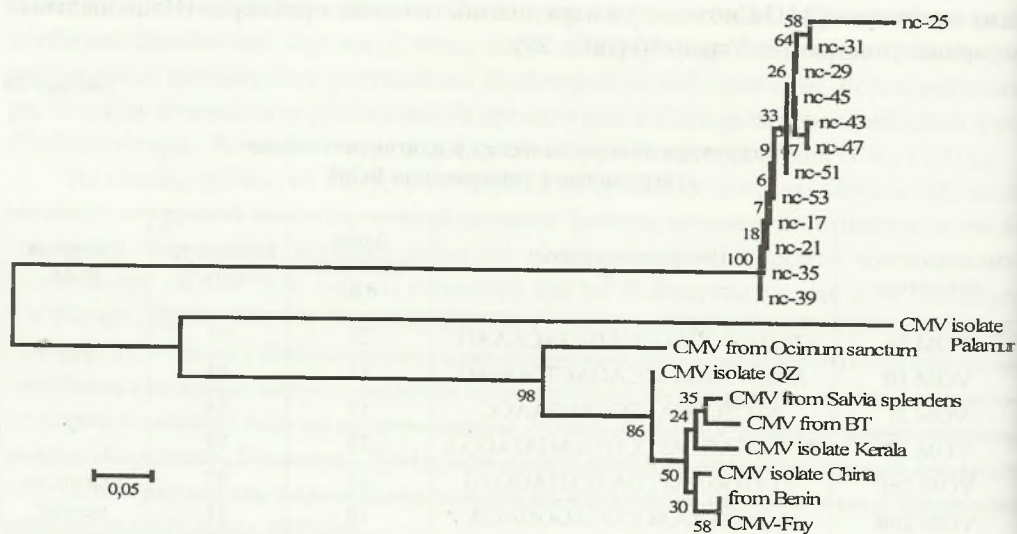


Рис. 33. Филогенетическое древо с использованием последовательностей ГБО ВОР трех приморских изолятов и последовательностей ГБО ВОР зарубежных изолятов, взятых из GeneBank

вирусологии ВНИИ сельскохозяйственной биологии РАСХН была исследована новая группа приморских изолятов ВОР, поражающих декоративные растения – петунию, катлею и камбрию (рис. 35), принадлежащих, как свидетельствуют результаты ПЦР-анализа, к подгруппе изолятов IV (восточноазиатские изоляты). Как было показано нами выше, приморские изоляты ВОР заметно отличались друг от друга как

nc-17	ВОМ5
nc-21	
nc-25	
nc-29	ВОМ4
nc-31	
nc-35	
nc-39	ВОМ7
nc-43	
nc-45	
nc-47	
nc-51	

Рис. 34. Популяция приморских изолятов ВОР. ВОМ5 – изоляты из катлеи, ВОМ4 – из петунии, ВОМ7 – из камбри

по физико-химическим, так и по биологическим свойствам. Скорее всего, эти различия могли быть обусловлены или «перетасовкой» («reassortment») отдельных компонентов вирусного генома, или рекомбинациями в области 5'- и 3'-нетранслируемых участков и в области открытых рамок считывания 3a и 3b (РНК 3): известно, что именно эти процессы ответственны за процесс эволюции ВОР и адаптации его к новым видам растений-хозяев. Проверка этой гипотезы в настоящее время проверяется и дополняется новыми данными.

Следовательно, природная популяция ВОР по биологическим, антигенным и физико-химическим свойствам в ДФО чрезвычайно не однородна. По биологическим свойствам дальневосточные изоляты ВОР отнесены к группе I ВОР, а по антигенным – к дальневосточному серотипу, имеюще-



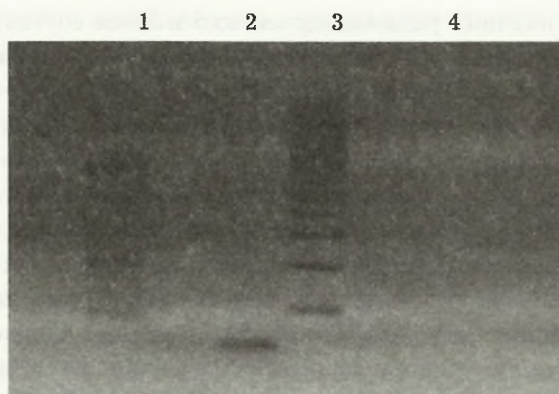


Рис. 35. Группоспецифическая ПЦР – диагностика изолята ВОМ из растений камбрии. Группоспецифичные праймеры (калифорнийские изоляты ВОМ). Подгруппы I и II. 1 – Primer F3, Strain Fny-R+F4, Strain Fny-L, 2 – Primer Q1, Strain Q-R+Q4, Strain Q-L ; 3 – Primer Q3, Strain Q-R+Q4, Strain Q-L, 4 – GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)

му слабые ммуногенные свойства. Они не распространяются с помощью семян, но хорошо передаются глями и механически. Проверка некоторых сортов овощных и декоративных культур на устойчивость к заражению дальневосточными изолятами ВОМ выявила разную степень устойчивости отдельных видов и сортов культивируемых растений.

Исследование видового разнообразия ВОМ имеет большую практическую значимость, так как вредоносность вируса очень велика. У большинства декоративных растений отсутствует иммунитет к этому вирусу, поэтому очень трудно выделить не только виды, но и сорта, устойчивые к ВОМ. Наиболее перспективно и экономически выгодно выращивание культурных растений вирусостойчивых сортов. Успешная защита культурных видов растений от этого вируса зависит от своевременного его выявления. Важнейшим мероприятием в борьбе с ВОМ является предварительное тщательное визуальное выявление больных растений, так как симптомы проявления ВОМ на зараженных овощных и декоративных растениях хорошо заметны. Больные растения необходимо сразу же уничтожить. Просматривать растения необходимо уже на семенных участках, так как наряду с ВОМ в смешанной инфекции встречаются вирусы, которые передаются через семена. Кроме того, необходимо проведение мероприятий, предотвращающих распространение вирусной инфекции. При этом обязательно соблюдение карантинных требований при ввозе растений из-за рубежа, регулярный фитосанитарный осмотр растений и тщательная их выбраковка, если при фитосанитарном обследовании присутствуют на растениях симптомы вирусного поражения. В последние годы в ДФО официально ввозится огромное количество посадочного материала из-за рубежа. Так, в розницу поступают луковицы декоративных культур из семейств: *Liliaceae* – гиацинты (более 11 сортов), тюльпаны (более 50 сортов и 5 бо-

танических видов), лилии (5 разновидностей по 5 и более сортов); *Amaryllidaceae* – нарциссы (более 35 сортов и 5 ботанических видов); *Iridaceae* – гладиолусы (более 37 сортов), крокусы (8 сортов и ботанических видов), ирисы (более 10 сортов), фрезии (более 5 сортов), тигридии (5 сортов); *Alliaceae* – декоративные луки (более 10 видов); *Cannaceae* – канны (6 сортов); *Compositae* – георгины (8 групп по 5 и более сортов). Учитывая то обстоятельство, что посадочный материал закупается коммерческими структурами по низким ценам, а значит, зачастую отработанный или выбракованный, то велика вероятность заноса материала, пораженного вирусами, и как результат – его массовое распространение луковицами и корневищами. Кроме того, существующая система фитосанитарного контроля не позволяет выявить наличие вирусов в поступающих из-за рубежа луковицах и корневищах декоративных культур. В настоящее время стали популярными многолетние и однолетние декоративные растения, поступающие к потребителю с закрытой корневой системой, что позволяет культивировать их в открытом грунте и более продолжительное время размножать черенками и розетками. Поэтому возникает реальная опасность появления и быстрого распространения новых, ранее не встречавшихся вирусных заболеваний, а также их переносчиков. Следовательно, необходимо детальное изучение поступающего зарубежного материала и мониторинг фитосанитарного состояния интродуцированных культур, их видов и сортов.

Таким образом, ВОМ, являясь природно-очаговым вирусом, относится к одному из самых распространенных и вредоносных на культурных растениях, главным образом на овощных и декоративных культурах как открытого, так и закрытого грунта.

### Вирус аспермии томатов *Tomato aspermy virus*

Вирус аспермии томатов (ВАТ) имеет палочковидные частицы с размерами: длина 190–115 нм, ширина 25–45 нм.

Заболевание, вызываемое этим вирусом, впервые описано в Англии в 1938 г. (Ainswort, 1938). Автор считал, как и многие исследователи в то время, что возбудителем подобного заболевания является один из штаммов ВОМ (по: Смит, 1960). Лишь спустя 10 лет установили, что заболевание вызывается самостоятельным вирусом. Окончательное название вирус получил при изучении заболевания томатов, вызывающего бессемянность плодов. Источником заражения были хризантемы, которые выращивались рядом с томатами. Возбудитель болезни получил название – вирус аспермии томатов. Обычно у большинства зараженных растений хризантем вирусная инфекция протекает бессимптомно. У некоторых сортов весной на листьях появляется хлоротичная крапчатость, хотя и слабо выраженная, но достаточная, чтобы отличить больные растения от здоровых. С ростом и развитием растений хризантем крапчатость на листьях становится мало заметной или вообще исчезает. Чаще всего признаки поражения вирусом четко прослеживаются на соцветиях, которые уменьшаются в размерах, цветки деформируются: лепестки венчика скручиваются, края их соединяются



в виде трубочки почти по всей длине или скручиваются так, что соцветия становятся беспорядочными. Как правило, цветки у многих зараженных вирусом растений распускаются неравномерно, соцветия приобретают однобокость и поэтому имеют мало привлекательный декоративный вид. Количество цветков в соцветии уменьшается на 10–15 %. Но у некоторых зараженных ВАТ растений соцветия бывают и без видимых признаков поражения. Оказывается, степень их деформации взаимосвязана с концентрацией вируса в растении. Время года также влияет на количественное содержание вируса в хризантемах, наивысшая его концентрация наблюдается в зимнее время года (Blenowre, Coldarell, 1949; Oertel, 1967).

На томатах, инфицированных ВАТ, наблюдается замирание точки роста. Последующее развитие пазушных побегов приводит к образованию характерной кустистости растений. Верхушки многих из них abortируются, и происходит дальнейшее ветвление. Листья несколько деформированы, с заметной темно-зеленой крапчатостью, а на верхней поверхности их черешков у основания обнаруживаются пролиферации. Если рост растений приостанавливается, то эти участки превращаются в активно растущие побеги. Уменьшается количество плодов, ухудшается их качество.

Основной симптом ВАТ на петунии – ненормальное развитие цветков: венчик растрескивается, его размеры уменьшаются, лепестки искривляются. Петуния, пораженная этим вирусом, почти не образует семян. У больных растений петунии листочки уродливые, несколько удлиненные. ВАТ вызывает симптомы и на других растениях: астре, калле, флоксе, примуле, циннии, физалисе, а также на перце, салате, сахарной свекле и др. (Klinkovski, 1968; Билай и др., 1988). На листьях *Tetragonia expansa* и *Ch. amaranticolor* после заражения вирусом наблюдаются четкие локальные пятна, на листьях *G. globosa* – через 15–25 дней локальные красные пятна с хлоротичной каймой.

Форма вирионов сферическая и составляет около 24–31 нм (рис. 36).

Физические данные некоторых изолятов ВАТ у разных исследователей имели отличные показатели. У обычного штамма: ТТИ– 50–55 °С, ПРС –  $10^{-2}$ , ПСИ –

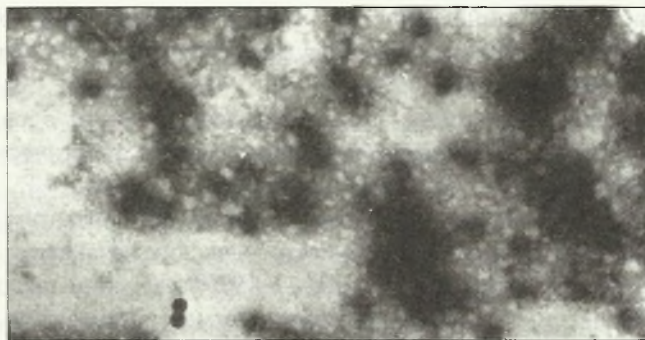


Рис. 36. Электронная микрофотография вирионов вируса аспермии томатов

2 сут (Hollings, 1955); у немецкого штамма ВАТ: ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 6 сут (Klinkovski, 1968); у изолята из петунии: ТТИ – 70 °С, ПРС –  $10^{-6}$ , ПСИ – 2 сут, у литовского изолята из хризантем: ТТИ – 70 °С, ПРС –  $10^{-4}$  (Макутенайте-Навалинскене, 1981). Таким образом, ТТИ колеблется от 50 до 70 °С, ПСИ – от 1 до 7 сут, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-7}$ .

Вирус распространяется повсеместно, где выращиваются декоративные и овощные культуры. Вредоносность его велика, так что цветочная продукция, пораженная вирусом, часто не пригодна к реализации из-за полной потери декоративности.

**Передача.** Способствует распространению вируса богатое сортовое разнообразие хризантем, интенсивный обмен посадочным материалом и насчитывающее сотни лет размножение вегетативным способом. Передача вирусной инфекции на тест-растения механическим путем в осенне-зимний период происходит без особых затруднений. Но этот способ переноса ВАТ на хризантемы не всегда бывает успешным. Есть данные о том, что при инокуляции соком 15 растений хризантем ни одно из них не заразилось. Из 27 растений, экспериментально зараженных соком табака с ВАТ, заразилось только 4 (Hollings, 1955). Эти данные говорят в пользу того, что в производственных условиях передача вируса при помощи орудий труда (ножом при срезке соцветий, черенковании и других работах) или руками практически не происходит. Вирус передается вегетативным размножением, но не передается семенами. Главную роль в его переносе играют различные виды тлей. Передача вируса при помощи *Myzus persicae* достигала в среднем 50 %, *M. solani* – 75 %, *Macrosiphosiella* – 80 % и *Rhopalosiphum rufomaculatum* – 25 % (Brierley et al., 1963). Тля персиковая легко передает этот вирус с табака на табак и томаты, так же, как с томатов на томаты, а последний вид тли – с хризантем на хризантемы.

ВАТ поражает более 100 видов растений из 24 семейств, 75 видов из них относятся к трем семействам: *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Solanaceae* (Hollings, Stone, 1971). Установлено, что изоляты из хризантем по сравнению с томатными – типичными изолятами ВАТ – могут поражать более широкий круг растений (Brierley et al., 1963; Hollings, Stone, 1971). Это ставит растения хризантем в число основных резервуаров ВАТ. В теплый период, когда хризантемы высаживают в открытый грунт, они могут служить источником заражения ВАТ многих декоративных культур. Экспериментально установлено, что к числу таких растений относятся астра, бессмертник, петуния, цинния и многие другие растения. (Kristensen, Transen, 1958; Meroni, 1969; Hollings, Stone, 1971).

ВАТ снижает урожай томатов, так как образуется мало плодов, и они бывают мелкими, деформированными. Иногда на них появляются некротические образования (Hollings, Stone, 1971).

Первые на ДВР ВАТ был обнаружен на растениях хризантем *Chrysanthemum indicum* L. при обследовании посадок в цветоводческих хозяйствах Приморского и Хабаровского краев, Амурской области в 1977–1979 гг. (Чуян, Крылов, 1979). Среди хризантем, выращиваемых в Приморском крае, отмечено значительное количество растений с деформированными соцветиями. Многие цветки распускались только с одной стороны и окрашивались неравномерно (рис. 37).





Рис. 37. Деформированные соцветия у хризантемы, пораженной ВАТ (фото А.Х. Чуян)

Пораженные растения теряли декоративность. На листьях вирусные симптомы обычно не проявлялись, лишь иногда были заметны, но иногда встречались растения со слегка крапчатыми листьями и более светлой окраской. Из 5 образцов внешне здоровых хризантем вирус выявили только в двух. ВАТ был передан на здоровые растения дурмана, петунии, гомфрены головчатой и огурца. Для установления круга растений-хозяев авторы использовали растения 33 видов из 9 семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae*. Симптомы заболевания ВАТ проявились на растениях 24 видов и сортов из 6 семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Scrophulariaceae* (Виллемсон, Толкач, 1989). Диагностическими видами служили *N. tabacum* L. cv. Xanthi: на 8 день на листьях зараженных растений появлялись локальные кольцевые пятна, через 14 сут – морщинистая мозаика и вторичные некротические пятна, у растений табака сорта Самсун на 12 день – системная морщинистая мозаика, а у табака клейкого – хлоротичные пятна на инокулированных листьях и крапчатая мозаика, спустя месяц на инокулированных листьях – деформация и нитевидность листьев. У *P. hybrida* на 12–15-й день наблюдали посветление жилок, мозаику, скручивание листьев и энации; распустившиеся цветки имели уродливую форму и изменение окраски. У *Phaseolus aureus* и *Vigna sinensis* появлялись некротические точки на инокулированных листьях на 2–4-й день.

Были определены физические свойства вирионов дальневосточного изолята ВАТ: ТТИ – 66 – 67 °С, ПСИ – 7–9 сут, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ .

ВАТ из хризантемы реагировал в РДД с антисывороткой, полученной латвийскими исследователями (Латвийская СХА, г. Елгава). По литературным данным известно, что выращивание хризантем и томатов в непосредственной близости приводит к

значительному снижению урожая томатов в результате поражения ВАТ. В ДВ регионе на томатах вирус не выявлен. Возможно, это связано с тем, что посадки томатов в основном были удалены от цветоводческих хозяйств.

Несмотря на большое сходство ВАТ и ВОМ по многим свойствам, их все же можно отличить по симптомам на тест-растениях. Во-первых, у таких растений, как *N. rustica*, *D. stramonium*, *Petunia hybrida*, ВАТ на обратной стороне инокулированных листьев вызывает образование выростов – энциций. Дальневосточный изолят ВАТ вызывал энциции на растениях махорки, петунии и дурмане (рис. 38).



Рис. 38. Симптомы ВАТ в виде энциций на обратной стороне листа растения махорки (А) и в виде узких деформированных, загнутых книзу листьев у томата (Б) (фото А.Х. Чужан)

ВАТ, в отличие от ВОМ, не вызывал у растений огурца *C. sativus* на листьях системной мозаики. Дальневосточным изолятом ВАТ не удалось заразить *C. sativus*, что свидетельствовало о том, что изучаемый изолят ВАТ из хризантем не имел примеси ВОМ.

С помощью иммунохимических методов мы попытались показать отличия между европейскими изолятами ВАТ и дальневосточным изолятом ВОМ, выделенным из гладиолуса гибридного, по антигенной специфичности и выявить у них видо- и родоспецифические эпитопы. Европейские изоляты ВАТ были представлены кавказским



(Институт общей генетики, г. Москва) и латвийским (СХА, г. Елгава, Латвия). Вирус накапливали на *N. tabacum* cvs. Samsun и Xanthi. Максимальная концентрация ВАТ в растениях отмечена на 10–12-й день после инокуляции и держалась на высоком уровне около 6 нед. Для получения очищенного препарата брали свежесорванные листья с ярко выраженными симптомами. Правда, как показали наши исследования, на конечный результат не влияет, если использовать листья, которые хранились не более 15 сут при  $-15^{\circ}\text{C}$ . Для получения очищенного препарата ВАТ использовали методику Н. Лот с соавт. (Lot et al., 1972) и сравнивали ее с методикой, используемой ранее латвийскими исследователями (Игнаш, Икаунице, 1976). Для гомогенизации подходит 0,5 М фосфатный буфер, рН 7,5–7,6. В основе выделения ВАТ лежат следующие этапы: осветление гомогената смесью бутанола с хлороформом, осаждение вируса несколькими циклами дифференциального центрифугирования. Высокоскоростное центрифугирование проводили при 30000 g в течение 2 ч через сахарозную подушку.  $A_{260/280} = 1,73\text{--}1,77$ . Очищенный препарат ВАТ сохраняется при  $-5^{\circ}\text{C}$  в течение 9–12 мес. Вирусные препараты хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ , добавляя глицерин, или лиофилизировали. Электрофоретически в препаратах ВАТ был выявлен один белковый компонент с м.м. 30 кДа, в процессе хранения препарата наблюдался протеолиз вирусных белков.

Полученные результаты еще раз убедили нас, что оптимальный срок работы с ВОМ и ВАТ – весенние месяцы (Гнутова и др., 1985). В осенне-зимний период выход ВОМ не превышал 70 мг/кг зараженного материала. В начале же апреля его количество в выделенном препарате составило 170 мг/кг, а ВАТ – 100 и 220 мг/кг соответственно. Вирусные препараты были без каких-либо примесей других вирусов, что подтверждали результаты электронной микроскопии.

Кроличьи поликлональные антисыворотки получали по двум схемам.

Первая (Lot et al., 1972): 1-е сутки – 0,4 мг вируса с полным адьювантом Фрейнда вводили п/к в 4–6 точек на шее; 30–40-е сутки – дозу антигена и адьюванта увеличили вдвое и вводили п/к в 4–6 точек на шее и в 5–7 точек вдоль позвоночника.

Вторая (С.И. Малышенко, МГУ): 1-е сут – 0,5 мг вируса с полным адьювантом Фрейнда вводили п/к в несколько точек вдоль позвоночника; 7-е и 14-е сутки – 1 мг вируса с адьювантом вводили в/м; 21-е сутки – 1 мг вируса в/в.

Титры антисывороток, полученных по первой схеме, составили в РДД для ВОМ 1:32–1:64, для ВАТ – 1:64–1:128; по второй схеме: для ВОМ – 1:32, для ВАТ – 1:128. Это указывает на то, что обе схемы равноценны. Однако первая имеет незначительные преимущества: во-первых, количество иммунизаций вдвое меньше, во-вторых, интервал между ними позволяет накопить инфекционный материал, в-третьих, для иммунизации используется свежeweделенный материал. Титр специфических антител по результатам непрямого варианта ИФА – 1:2000–1:6400. Приготовленная антисыворотка против ВАТ четко реагировала с гомологичным вирусом в реакции КА.

Непрямым вариантом ИФА ВАТ выявляли в соке зараженных растений в разведении 1:50–1:1000, а в очищенных препаратах – 3–5 мкг/мл вируса.

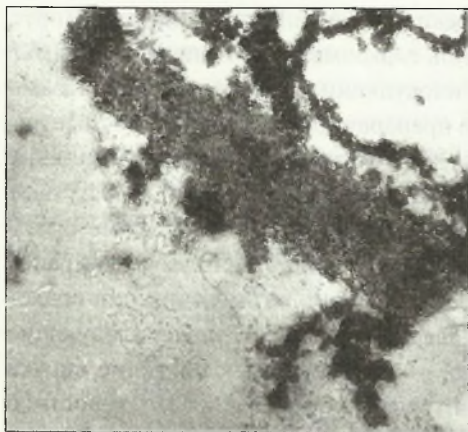


Рис. 39. Декорирование вирионов ВОМ антителами к ВАТ методом иммунной электронной микроскопии

между вирусом и гомологичной антисывороткой. Смесь антител к ВАТ и ВОМ с гомологичным и гетерологичным антигенами реагировала образованием перекрещиваемых линий в РДД. Подобные результаты объясняются по-разному. Одни авторы считают, что это свидетельствует об отсутствии идентичных эпитопов между вирусами (Петров, 1987), другие, что это является доказательством частичного антигенного родства между ними (Rao et al., 1982). Для уточнения полученного результата мы использовали более чувствительный иммунохимический метод РИЭФ и получили данные о наличии общих эпитопов у изучаемых видов рода *Cuscutovirus*. Это свидетельствовало в пользу того, что между ВОМ и ВАТ существовало антигенное родство. В количественном отношении (по высоте ракет) получено, что дальневосточный изолят ВАТ из хризантем был более близок к дальневосточному, а не европейскому серотипу ВОМ.

Непрямым методом ИФА в каждой системе исследуемых вирусов были получены кривые титрования гомологичных и гетерологичных антисывороток. Одинаковый характер кривых указывал на наличие антигенного родства между вирусами одного рода и тем самым подтверждал результаты РИЭФ.

По результатам РДД было показано, что активность лиофилизированных препаратов ВОМ и ВАТ терялась полностью через полгода их хранения при температуре 4 °С, в то время как формализированные вирусные препараты не теряли антигенной активности более года.

Таким образом, полученные результаты позволяют отнести европейский и дальневосточный изоляты ВОМ к разным серотипам. Оба серотипа проявляли средние иммуногенные свойства. Из-за низкой чувствительности РДД не обнаружены общие эпитопы капсидных белков у ВОМ и ВАТ. Более чувствительные иммунохимические методы – РИЭФ и ИФА – показали наличие антигенного родства между изучаемыми

Антигенное родство между дальневосточными изолятами ВОМ и ВАТ устанавливали с помощью РДД, РИЭФ, ИЭМ и непрямого варианта ИФА. Полученные данные свидетельствовали о наличии как общих, так и индивидуальных эпитопов капсидных белков у вирусов (рис. 39). Образование шпоры в РДД указывало на их неидентичность и возможность отнести оба изолята к разным видам. Учитывая, что изолят ВОМ, выделенный из гладиолуса, идентичен по антигенным свойствам изолятам ВОМ, изученным нами ранее, мы относим его дальневосточному серотипу.

ВАТ в РДД не показал антигенного родства ни с одним из штаммов ВОМ.

Линии преципитации наблюдались только



кукумовирусами, причем ВАТ и дальневосточный серотип ВОМ были наиболее близки по антигенным свойствам.

Итак, полученные данные по кругу растений-хозяев, морфологии, физическим параметрам вирионов, антигенным свойствам капсидных белков изолята ВАТ из хризантем позволили сделать вывод о том, что вирус имеет распространение на юге Дальнего Востока России.

### Вирус задержки роста сои Soybean stunt virus

Заболевание на сое, вызывающее задержку роста растений, было впервые описано японскими исследователями Ю. Косимидзу и Н. Иидзуки (1963), которые назвали возбудитель этого заболевания вирусом задержки роста сои (ВЗРС) *Soybean stunt virus (SSV)*. Исследователи обратили внимание на то, что на оболочке семян сои, собранных с больных растений, образовывался кольцевой узор, отличавшийся от коричневой крапчатости, появлявшейся на оболочке, пораженной вирусом мозаики сои (ВМС), которая независимо от штамма имела концентрическую, полосатую или седловидную форму и располагалась перпендикулярно от рубчика к брюшной стороне семян. Другой отличительной особенностью служило то, что инкубационный период у неизвестного вирусного патогена проходил быстрее, чем у ВМС (5–7 дней), после чего на развернувшихся первичных листьях появлялись мелкие серые пятна, то есть вирусные симптомы появлялись на сое сразу же после прорастания семян. В отличие от ВМС, на инокулированных и первичных листьях некрозы отсутствуют. На семядолях исследователи отмечали мозаичную пятнистость, состоящую из темно- и светло-зеленых участков. Помимо характерных симптомов для ВЗРС в виде мелких серых пятен, на первичных листьях наблюдается и наклон верхушки проростка книзу. Листья больных растений сои в зависимости от сорта были меньше по размеру, чем здоровых, и становились несколько продолговатыми, края их часто закручивались, на них появлялся слабый рисунок мозаики или же мелкая пузырчатость. Рост больных растений ослаблялся. Часто имело место опадение цветков и бобов, созревание семян запаздывало. По данным японского исследователя Т. Иноуэ (1969), вирионы ВЗРС имели сферическую форму диаметром 30 нм. ТТИ – 55–60 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 2–3 сут.

Вирус легко передается инокуляцией соком, различными видами тлей и семенами. ВЗРС, по данным японских исследователей, в 40–100 % случаев передается через семена (Hanada, Toshihara, 1982). У всех сортов, пораженных вирусом, наблюдали пигментацию кольцевого типа на оболочке семян, окраска которой соответствовала цвету рубчика (например у сортов со светлым рубчиком образовывались светло-коричневые кольца).

Растение-хозяин ВЗРС в природе – соя *Glycine max*. Японские исследователи для изучения общего круга растений-хозяев испытали растения 97 видов из 16 семейств.

Вирус поражал растения из 7 семейств: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Polygonaceae*, *Pedaliaceae*, т. е. имел довольно широкий экспериментальный круг растений-хозяев (Танака и др., 1969).

ВЗРС распространен в некоторых странах АТР – Китае, Индонезии, Японии, России и др. В Индии он не выявлен. Китайский изолят (*CMV-China soybean stunt strain*) впервые был идентифицирован из растений сои *Glycine max*. Вирус передавался механически соком и семенами сои (31–100 %), а также глями *M. persicae*. Японский штамм ВЗРС не заражал томаты (Liang, 1998).

По последним данным азиатских исследователей, ГТИ в зависимости от штамма вируса варьируется в широких пределах от 45 до 65 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 3–5 сут. Вирионы изометрической формы, 28–30 нм в диаметре (Murayama, 1998).

В Амурской области были выделены отдельные растения сои с симптомами мозаики, сок которых не реагировал в реакции КА с антисывороткой к ВМС. Вирус удалось передать с помощью механической инокуляции на растения клевера красного, табака клейкого и гороха посевного. На 7-е сутки на молодых листьях клевера четко проявлялась мозаика, иногда наблюдался общий хлороз и морщинистость листьев. На вновь образуемых листьях табака и гороха, инокулированных вирусом, хорошо были заметны посветление жилок и размытая мозаика. У растений сои при поражении дальневосточным изолятом ВЗРС высота стеблей была на половину короче, чем у здоровых. Междоузлия и черешки листьев становились также короткими, развивалось много боковых побегов. В клетках пораженных растений вирус не образовывал вирусных включений. На листьях возникали крупные одиночные вздутия темно-зеленого цвета. По антигенным и биологическим (круг растений-хозяев, характерная пигментация семян сои) свойствам, а также по результатам электронной и световой микроскопии вирусный патоген был отнесен к вирусу задержки роста сои (Рейфман, Поливанова, 1969; Поливанова 1974).

Поскольку ВЗРС рассматривался как характерный вирус для сои в Дальневосточном регионе России, требовался для его диагностики в полевых условиях быстрый и надежный серологический метод. С этой целью нами была получена антисыворотка к дальневосточному изоляту ВЗРС. Первоначально вирус размножали и накапливали в листьях растений сои и вигны *Vigna sesquipedalis* (сорт *Kuradanesauzyakusasage*). Передача инфекции из этих растений на бобы конские *Vicia faba*, фасоль обыкновенную *Ph. vulgaris*, табаки *N. tabacum* и *N. glutinosa*, а также на дурман обыкновенный *D. stramonium* свидетельствовала о моноинфекции и указывала на то, что в инфекционном материале отсутствуют ВМЛ, ВЖМФ и ВКПТ. Антисыворотка к ВМС также не выявила этот вирус в соке инфицируемых растений.

Очистка вируса из сока зараженных растений сои затруднительна. Вирус хорошо накапливался в листьях *N. tabacum*, что для нас было неожиданностью. Через неделю после инокуляции листья этих растений использовали для выделения вируса по методу Н. Скотта (Scott, 1963) с нашими модификациями. Вирус вводили кроликам внутримышечно дважды с недельным интервалом и спустя две недели внутривенно



трижды через день. В качестве адьюванта использовали смесь 1 %-ного раствора альгината натрия и желатины. Вирус оказался неплохим иммуногеном. Антисыворотка, полученная нами к ВЗРС, имела титр специфических антител 1:512, не реагировала с соком здоровых растений, вирус хорошо выявлялся реакцией КА в соке инфицированных растений. Полученная антисыворотка была использована при обследовании посевов сои в Амурской области, Хабаровском и Приморском краях, а позже с ее помощью вирус выявили на посевах сои в Молдове и Краснодарском крае (Поливанова и др., 1976).

Тахакаси с соавт. (1963; 1969), изучая различные изоляты ВЗРС, показали антигенное родство не только между ними, но и с ВОМ, но не с ВМС. На основании этих и других результатов по изучению ВЗРС они первыми высказали предположение о принадлежности вируса к роду *Cucumovirus*. Таким образом, ВЗРС пополнил список вирусов, поражающих сою — одну из важных в экономическом плане культур. В дальнейшем при использовании молекулярно-генетических методов может появиться большая уверенность в том, что этот вирус является законным представителем рода *Cucumovirus* семейства *Bromoviridae*.

## Семейство Comoviridae

По современной таксономии вирусов растений, семейство комовирида представлено тремя родами:

Таксономическая структура семейства

Роды:

*Comovirus*    *Fabavirus*

*Nepovirus*

Типовые представители родов *Comovirus*: вирус мозаики коровьего горошка *Cowpea mosaic virus*, *Fabavirus* – вирус увядания бобов 1 *Broad bean wilt virus 1* и *Nepovirus* – вирус кольцевой пятнистости табака *Tobacco ringspot virus*.

Происхождение названий родов: *como* – от сокращения *cowpea mosaic*; *faba* – бобы (*Vicia faba*); *nepo* – сокращение от *nematode polyhedral*, указывающее на способ передачи нематодами и морфологию вирионов.

**Физико-химические и физические свойства.** Вирионы без внешней оболочки, имеют диаметр 28–30 нм и икосаэдрическую симметрию (T= 1), содержат две молекулы (+)РНК с VPg на 5'-конце. Препараты вируса разделяют на три седиментирующих компонента: Т (top – верхний, содержащий пустые частицы), М (middle – средний, содержащий частицы с одной молекулой РНК 2) и В (bottom – нижний компонент, содержащий частицы с одной молекулой РНК 1).

Вирионы термоустойчивы, ТТИ выше 60 °С, слабо чувствительны к органическим растворителям, константа седиментации для компонента Т равна 49–63 S, для М – 86–128 S и В – 113–134 S у вирусов разных родов. М.м. вирионов – 3,2–3,8 кДа (Т), 4,6–5,8 кДа (М) и 6,0–6,2 кДа (В). Плавающая плотность комо- и неповирусов в CsCl – 1,28–1,30 (Т), 1,41–1,48 (М) и 1,44–1,53 (В) г/см<sup>3</sup>.

**Геном** состоит из двух видов линейной (+)онРНК, необходимых для системной инфекции. РНК 1 неповирусов имеет длину 7,2–8,4 т.п.о., РНК 2 – 3,9–7,2 т.п.о., у комо- и фабавирусов длина РНК 1 – 5,9–7,2 т.п.о. и РНК 2 – 3,5 т.п.о. В геномных РНК комо- и неповирусов присутствует поли (А) на 3'-конце, VPg на 5'-конце с м.м. 4–6 кДа.

**Белки.** Комовирусы и фабавирусы имеют два белка оболочки – 40–43 кДа и 22–27 кДа; неповирусы – один белок 55–60 кДа. Частицы содержат 60 копий белка. Комо- и неповирусы образуют полипротеин, из которого протеолитическим расщеплением формируются структурные и неструктурные белки (кодируемый РНК 2 транспортный белок и кодируемые РНК 1 НТФ-связывающий белок, VPg, протеиназа и полимеразы).

**Липиды и углеводы** не выявлены. Возможно гликозирование белков оболочки комовирусов.

Общая геномная РНК инфекционна, разделенные виды РНК самостоятельно не инфекционны. Вирионы собираются и аккумулируются в цитоплазме, часто в виде



кристаллов и паракристаллов. Выявляются также в тубулах, проникающих из клетки в клетку, которые могут быть местом их межклеточного транспорта. РНК 1 комо- и неповирусов несет информацию для репликации и может самостоятельно реплицироваться в протопластах, не образуя вирионов (белок оболочки кодируется РНК 2). Оба вида РНК транслируются в полипротеины, которые расщепляются на функциональные белки.

**Биологические свойства.** Комовирусы имеют узкий круг растений-хозяев, у непо- и фабавирусов он более широкий. Комовирусы успешно передаются жуками, особенно из семейства *Chrysomelidae*, фабавирусы – тлями, большинство неповирусов – нематодами. Все вирусы передаются механической инокуляцией. Для неповирусов обычна семенная передача, для видов других родов она встречается редко.

**Антигенные свойства.** Вирусы являются хорошими иммуногенами. Виды одного рода имеют антигенное родство, выраженное в разной степени.

На ДВ России выявлены вирусы двух родов: *Comovirus* и *Nepovirus*.

### Род *Comovirus*

Род включает около 20 вирусов. Вирионы представлены полиэдрическими частицами с диаметром 24–32 нм.

**Свойства вирионов.** Вирусный капсид состоит из двух видов структурных белков: большой – 42 кДа и малый – 22 кДа. Геном комовирусов представлен двумя раздельными инкапсулированными нитями (+)РНК с м.м. 2,4 мДа (РНК 1) и 1,4 мДа (РНК 2). РНК 1 содержит 5900–7200 нт.; РНК 2 – 3500–4500 нт. Более мелкий полипептид (а у некоторых комовирусов оба) может частично деградировать в результате протеолитического расщепления *in vivo* и *in vitro*. Белки оболочки могут быть гликолизированы. Частицы комовирусов имеют три компонента: Т, М и В, которые содержат соответственно 0,25% и 37% по массе РНК с  $S_{20,w}$  – 58, 98 и 118 S имеют м.м. белка – 3,8; 5,2; 6,2 кДа. Коэффициенты диффузии всех 3 компонентов – около  $1,30 \times 10^5 \text{ см}^2/\text{с}$ . Плавающие плотности в CsCl – 1,29 (Т), 1,41 (М), 1,44 (В) г/см<sup>3</sup>.

**Липиды** не обнаружены (характеристика семейства цит. по: В.Г. Краев, 2001).

**Биологические свойства.** Комовирусы имеют узкий круг растений-хозяев. Это растения семейств: Крестоцветные *Brassicaceae*, Тыквенные *Cucurbitaceae*, Пасленовые *Solanaceae* и Бобовые *Fabaceae*. Характерные симптомы: мозаика, крапчатость.

Вирусы этого рода стабильны, ТТИ в пределах от 65 до 85 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – от 8 до 22 сут.

**Антигенные свойства.** Комовирусы – неплохие иммуногены. Среди комовирусов выявлено антигенное родство. Так, вирус мозаики редиса проявлял слабое родство с вирусами крапчатости бобов фасоли *Bean pod mottle virus*, мозаики вигны *Cowpea mosaic virus* и мозаики тыквы *Squash mosaic virus* (Campbell, 1964; Kassanis et al., 1973). Большинство вирусов до 80-х годов прошлого столетия благодаря наличию в капсидном белке идентичных антигенных детерминант были объединены в группу комовирусов (Bruening, 1978; Matthews, 1982).

**Передача.** Вирусы легко передаются механически. В природе передаются жуками-листоедами из семейств *Chrisomelidae*, *Coccinelidae*, которые долгое время сохраняют эту способность (Freitag, 1956; Fulton et al., 1980; Viellasa, Monfessoro, 1987). Комовирусы не могут размножаться в насекомых, но долго сохраняются в них благодаря своей стабильности и способности накапливаться в растении в высокой концентрации. Некоторые комовирусы, такие, например, как вирусы мозаики вигны, мозаики тыквы и другие, могут передаваться семенами, при этом для вируса мозаики редиса семенная передача не обнаружена (Campbell, 1973). Вирус мозаики вигны в семенах может сохраняться до 10 лет (Мазьярд, 1971).

### Вирус мозаики редиса *Radish mosaic virus*

Впервые вирус мозаики редиса (ВМР) обнаружен в США (Tomprkins, 1939). Это сферические вирионы диаметром 28–30 нм. Вирус имеет два структурных полипептида с м.м. 40 и 20 кДа. Полипептиды при электрофорезе видны в виде 3 зон, соответствующих 3 полипептидным цепям с м.м. 40, 20 и 24–26 кДа. У РНК обнаружены 3'-концевые поли(А)-последовательности, гетерогенные по размерам (Сапоцкий, Дрыгин, 1990).

Дальневосточный изолят ВМР идентифицирован на юге Приморского края из растений лобы (китайской редьки) *Raphanus sativus* L. subsp. *sinensis* (Mill.) Sazon var. *loba* Sazon, позже вирус был выявлен на растениях редиса. Растения, пораженные ВМР, были сильно угнетены в росте, наблюдалась мозаика и сильная деформация листьев, слабый некроз жилок. Особенно сильно страдали от инфекции растения второго года выращивания. В посадках овощных культур на юге ДВР вирус часто встречался на растениях вместе с вирусом мозаики турнепса (Крылов, 1992).

Вирус поражал растения 4 семейств (*Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*): редис, свеклу, шпинат, турнепс, китайскую редьку, цветную капусту, горчицу полевую и др. Симптомы варьировались в зависимости от вида растения. У растений редиса и лобы наблюдали угнетение в росте, мозаичность и сильную деформацию листьев, слабый некроз жилок, особенно сильно поражались растения китайской редьки второго года выращивания. ВМР вызывал симптомы системной крапчатости. Растения турнепса реагировали на заражение ВМР карликовостью, на листьях развивался хлороз, некротические пятна, линии и кольцевые узоры, некроз черешков и курчавость молодых листьев.

Известны северо-американский, европейский (HZ) и японский (Japanes) штаммы ВМР, которые отнесены по антигенным свойствам к двум серологическим субгруппам: американо-японской, или типичной, (изоляты из Калифорнии и Японии) и европейской. В Европе вирус распространен значительно шире, чем в США и Японии. Европейский серотип отличается от американо-японского тем, что не вызывает симптомов на цветной капусте *Brassica cauliflora* var. *botrytis* (Mill.) Litzg. Оба серотипа поражают растения из семейства крестоцветных (Spak, Kubelkova, 2000).



В качестве переносчика известны жуки-листогрызы *Diabrotica undecimpunctata* и жуки-долгоносики *Epitrix hertipennis* (Билай и др., 1988).

В клетках листьев растений лобы и капусты обнаружены при поражении вирусом крупные сферические или эллипсоидальные зернистые тельца с редкими вакуолями, аналогичные образованиям, описанным для клеток турнепса. Включения найдены только в листьях с характерными симптомами, вызываемыми вирусом. После обработки раствором Люголя тельца становятся темно-желтыми, при окрашивании флоксином – темно-розовыми. Это указывает на значительное содержание в них белка. В препаратах из сока больных растений были обнаружены как отдельные сферические частицы, так и небольшие агрегаты вирионов, иногда окруженные мембраной (Штейн-Марголина и др., 1988). Авторы показали, что на электронных срезах они видны как электронно-плотные сферические частицы диаметром 22–26 нм. Если они располагаются не группами, а лежат по одиночке в цитоплазме, отличить их от рибосом почти невозможно, ибо они имеют такую же плотность и диаметр. Как в клетках паренхимы, так и в клетках эпидермы и сосудистых пучков часто наблюдались мелкие и крупные группы и сотоподобные упаковки частиц ВМР в вакуолях. В клетках верхней эпидермы вирионы ВМР образовывали также кристаллические включения, состоящие из взаимно перпендикулярных слоев сферических частиц. Крупные кристаллы обычно свободно лежат в вакуоли, более мелкие кристаллы могут располагаться и в цитоплазме. В цитоплазме клеток хлоренхимы изредка встречались трубчатые структуры, состоящие из цепочек вирионов, лежащих между двумя мембранами. Обычно эта цепочка однослойная, но иногда состоит из 2–3 рядов частиц. Авторы наблюдали однослойные и многослойные агрегаты частиц типа «частокола», лежащие в цитоплазме непосредственно под тонопластом, но не имеющие пограничной мембраны. Сравнение ультраструктуры клеток здоровых и зараженных растений показало, что серьезных патологических изменений клеточных органелл в больных растениях не наблюдается. Можно лишь отметить, как замечают авторы, незначительную деструкцию и набухание митохондрий, образование пластоглобул и накопление крахмала в хлоропластах. С помощью электронного микроскопа в препарате ВМР были выявлены сферические частицы диаметром 28 нм.

ТТИ – 75–80 °С, ПРС –  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – более 16 сут.

Дальневосточный изолят ВМР лучше всего размножался и накапливался в течение 3 нед в растениях лобы. Вирус легко передавался путем механической инокуляции. Инфицированные листья растений лобы использовали для получения очищенного препарата вируса. Очистку вируса проводили по методике Б. Кассаниса с соавт. (Kassanis et al., 1973) в нашей модификации. Гомогенизацию свежесорванных листьев проводили в 0,1 М ЭДТА при pH 7,5–7,7, pH устанавливали добавлением NaOH в объеме, равном половине объема отжатого сока. Вируссодержащую жидкость осветляли смесью хлороформа и бутанола (1:1) в пропорции 1/4, встряхивали 20 мин и центрифугировали при 5000 г 20 мин. Вирус осаждали 10 %-ным ПЭГ с 0,3 М NaCl, осадок, который формировался в течение нескольких часов, затем осаждали центрифугированием при 10000 г 30 мин. Экстрагирование осадков проводили в 0,05 М фосфатном

буфере, pH 7,5, и смесь центрифугировали при 3000 g 10–15 мин (экстракцию проводили 3–4 раза). Затем следовало 2 цикла дифференциального центрифугирования (95000 g и 6000 g).

Полученный препарат имел типичный спектр поглощения нуклеопротеида с минимумом при 240 нм и максимумом при 260 нм.  $A_{260/280} = 1,6$ . Для определения концентрации вируса в препарате использовали коэффициент экстинкции 8,5 (Kassanis et al., 1973). Выход вируса при выделении в зимний период составил 50–100 мг/кг листьев редьки или лобы, а из китайской и хибинской капусты – 3 мг/кг. Такое же небольшое количество вируса получали в летний период из лобы или редьки.

**Антигенные взаимоотношения европейского и американо-японского штаммов ВМР.** Для изучения антигенных взаимоотношений использовали РДД, ее ставили по общепринятой методике. Дальневосточный изолят ВМР оказался хорошим иммуногеном. Схема иммунизации кроликов включала в/в и в/м инъекции очищенного вирусного препарата. Доза за весь цикл иммунизации составила 5 мг. Считаем, что трехкратное введение ВМР-иммуногена в количестве не менее 1 мг 3-кратно с адьювантом Фрейнда с недельным интервалом дает возможность получить активную поликлональную антисыворотку. Реиммунизация поддерживала титр специфических антител длительное время на относительно высоком уровне. В реакции КА титр специфических антител составил 1:4096, в РДД – 1:16. Дальневосточный изолят ВМР в РДД реагировал с антисывороткой от доктора Ф. Кэмпбелла из США, приготовленной против американо-японского изолята вируса. Надо отметить, что идентификация ВМР, а также вирусов морщинистой мозаики турнепса, желтой мозаики турнепса и розеточности турнепса без применения специфических антисывороток крайне затруднительна (Campbell, 1973). При идентификации патогена вирусы желтой мозаики и розеточности турнепса исключались, так как эти вирусы заражают только растения семейства крестоцветных. Дальневосточный изолят ВМР заражал растения не только этого семейства, но и растения семейств бобовых, тыквенных, пасленовых и амарантовых. Разница была и при определении ТТИ и ПРС вирионов. Так, для вируса морщинистой мозаики турнепса ТТИ – 80–90 °С, время выстаивания более 30 сут. Кроме того, доктор Холингс сообщил, что антисыворотка, приготовленная нами и переданная ему для подтверждения специфичности нашей сыворотки к ВМР, не имела антител к вирусу морщинистой мозаики турнепса.

Таким образом, обнаруженное нами антигенное родство с американо-японским (типичным) штаммом ВМР и подтверждение этого результата методами биологического тестирования, а также изученные физико-химические свойства дальневосточного изолята ВМР (Сапоцкий, 1990) давали основание отнести его к типичному штамму ВМР, представителю рода *Comovirus* семейства *Comoviridae*.

### Вирус крапчатости красного клевера *Red clover mottle virus*

Вирус детально изучался украинскими исследователями (Билай и др., 1988). По их данным, вирус имел сферические частицы диаметром 30 нм. Поражал он в основ-



ном растения красного клевера и гороха. На сеянцах растений красного клевера развивался хлороз жилок через 12–15 сут после инокуляции. Затем на листьях отмечали хлороз, крапчатость, хлоротические кольца и пятна, морщинистость.

В природе вирус распространяется клеверными побеговыми долгоносиками *Arion apricans*, *A. varipes*. Растениями – резерватарами вируса являются многолетние бобовые.

ТТИ – 63–75 °С, ПРС – 10<sup>-5</sup>–10<sup>-6</sup>, ПСИ – 29 сут при комнатной температуре.

Вирус распространен в Европе в странах с умеренным климатом.

Вирус упоминается в монографии А.В. Крылова (1992) как вид рода *Comovirus*. Это единственное сообщение о выявлении вируса на растении гороха в ДФО России. Автором приводится краткая характеристика некоторых свойств биологического тестирования. В дальнейшем вирус в агро- и биоценозах Дальнего Востока не выявляли.

### Род *Nepovirus*

Вирионы неповирусов имеют форму сферических частиц диаметром 28–30 нм.

**Свойства вирионов. Физико-химические свойства.** Вирусные частицы обычно очень стабильны и у большинства представителей рода седиментируют тремя компонентами – Т, М и В с  $S_{20,w}$  соответственно 49–56, 86–128 и 115–113 S. Коэффициент диффузии всех трех типов частиц –  $1,5 \times 10^{-7}$  г /см<sup>3</sup>. Плавающие плотности в CsCl – 1,28 (Т), 1,43–1,48(М) и 1,51–1,53 (В) г /см<sup>3</sup>.

Капсид неповирусов состоит из одного белка с м.м. 55–60 кДа, хотя у некоторых предполагаемых вирусов рода после деградации капсида образуется 2–3 меньших полипептида 21–44 кДа. Геномная РНК 1 транслируется в один полипротеин 250 кДа, из которого при процессинге образуются функциональные белки (нуклеотидсвязывающий белок, VPg, протеаза, полимеразы), РНК 2 – в полипептид 105–165 кДа, из которого образуются три белка, в том числе транспортный белок и белок оболочки.

*Липиды и углеводы* не обнаружены.

Неповирусы являются относительно стойкими патогенами.

ТТИ – 55–70 °С, ПРС – 10<sup>-3</sup>–10<sup>-4</sup>, ПСИ – от нескольких дней до нескольких недель.

В цитоплазме вирусы присутствуют в виде везикулярных включений, обычно примыкающих к ядру.

Представители неповирусов имеют широкий круг растений-хозяев. Это многие дикие древесные и сорные растения. Для них характерны симптомы кольцевой пятнистости и ланчатой узорчатости. Листья растений, выросшие после инфицирования, могут не нести симптомов. Отмечено, что эти вирусы проникают в корни растений, если инфицировать листья. У плодовых и винограда от заражения корней до появления симптомов на листьях проходит 2–3 года (Вердеревская, Маринеску, 1985). У некоторых неповирусов на появление симптомов могут влиять сателлитные РНК (линейные или циркулярные).

Неповирусы легко передаются механической инокуляцией сока на травянистые растения-хозяева. Весьма обычна передача семенами. Многие передаются пылью и нематодами, например лонгидоридами *Longidoridae* или кхифинемами *Xiphinema*, при этом для некоторых штаммов переносчики неизвестны. Нематоды сохраняют способность передавать вирус спустя недели и месяцы, не теряют ее после линьки. В переносчике вирусы не размножаются (Маринеску, 1973; Билай и др., 1988).

Почти все неповирусы – хорошие антигены. Вследствие стабильности этих вирусов очистку их можно проводить относительно простыми методами, подвергая материал замораживанию перед очисткой для удаления компонентов клетки растения-хозяина (Косаковская, 1981).

Вирусы широко распространены в умеренных по температурному фактору регионах. Неповирусы на ДВ России представлены 5 видами – мозаика резухи, кольцевая пятнистость томата, кольцевая пятнистость малины, кольцевая пятнистость табака.

### Вирус мозаики резухи *Arabis mosaic virus*

Вирус мозаики резухи (ВМРе) впервые описан на резухе *Arabis hirsute* (Smith, Markham, 1944; цит. по: Вердеревская, Маринеску, 1985). Вирус поражает дикорастущие и культурные виды растений, включая овощные, декоративные, ягодные культуры и виноград. Изучены несколько штаммов вируса – типичный, хмелевой, вееролистности винограда и др.

На резухе шершавой вирус вызывает появление темно-зеленых колец и линейного узора, хорошо заметных на светлом фоне листа, а также слабой крапчатости, на листьях малины – желтую карликовость, на землянике – желтую морщинистость, на декоративном кустарнике форзиции – желтую сетчатость. Вирус поражает бузину, черешню (Билай и др., 1988). При инфицировании вирусом у растений гвоздики укорачиваются междоузлия и идет чрезмерное образование боковых побегов, иногда наблюдается карликовость растений. В отдельных случаях поражается не все растение целиком, а только его часть, тогда на одном из побегов растения одновременно трогаются в рост все его спящие боковые почки, узлы гипертрофируются, побеги искривляются.

По литературным данным, ВМРе распространяется вегетативно с посадочным материалом, пылью и семенами. В природе переносчиком являются нематоды *Xiphinema diversicaudatum* и *X. coxi* (Вердеревская, Маринеску, 1985; Билай и др., 1988).

Вирус распространен в большинстве стран Европы, зарегистрирован в Новой Зеландии, республике Молдова и в России в нечерноземной полосе.

На ДВ России ВМРе был обнаружен О.Г. Гордейчук с соавт. (Gordeichuk et al., 1977) на ягодных культурах (смородине и малине). Ранней весной и в начале лета на отрастающих листьях смородины ясно видно пожелтение жилок и тканей вдоль них. С развитием растений появляются листья с пестрой окраской тканей (ткани листа окрашены в различные цвета, от бледно-зеленого до желтого с антоциановым нале-



том). К периоду созревания ягод подобные симптомы обычно маскируются благодаря более яркому проявлению антоцианового налета на большинстве листьев. На растениях малины авторы наблюдали пестролепестность и пожелтение жилок. При прививках черенков, взятых от исходных растений, на сеянцы малины *Rubus dicensha* и *Rubus occidentalis* на листьях подвоя спустя 3–5 нед отмечалось пожелтение жилок и слабая бледно-зеленая мозаика. Механическая передача вируса осуществляется с трудом, наиболее успешно она проходила, когда в инокулюм добавляли определенные стабилизирующие агенты. Вирусом заразились растения трех видов мари, гомфрены шаровидной, дурмана, петунии, нескольких видов табаков и фасоли обыкновенной. Симптомы были сходными с описанными в литературе для ВМРе. Наиболее типичная реакция на заражение вирусом отмечена на растениях петунии, мари и фасоли. Обратная передача инфекции на сеянцы смородины более успешно происходила в стадии 4–5 листиков. При более позднем заражении процент заболевания был невелик (10–15 %).

Вирионы имели сферическую форму диаметром 30 нм.

ТТИ – 57–58 °С, ПСИ – 4 сут, ПРС – 10<sup>4</sup>.

Для выявления вируса в растениях с вирусными симптомами использовали анти-сыворотку, полученную от доктора Р. Стейс-Смита. В РДД наблюдали четкую полосу преципитации, сформированную специфическими противовирусными антителами и соком из зараженных ВМРе тест-растений и смородины.

На ДВ России ВМРе в одинаковой степени поражал и малину, и смородину, учитывая их нередкое тесное соседство в посадках. Дальневосточный изолят ВМРе по характеру симптомов, физическим свойствам вирионов и кругу поражаемых растений близок изоляту из черной смородины, описанному в Германии (Kleinhempel, 1971).

### Вирус короткоузлия винограда *Grapevine fanleaf virus*

Виноград широко культивируется во многих странах мира, но не менее 10% урожая ежегодно теряется по причине вирусных заболеваний. Вирусные болезни могут подавлять рост корней, побегов, листьев, ягод, препятствовать опылению, вызывать пигментацию разных органов и нарушать различные аспекты метаболизма – перенос ассимилятов, дыхание, фотосинтез. Больные кусты могут погибнуть. Довольно часто вирусные болезни протекают в скрытой форме – без видимых симптомов заболевания (Милкус, 1982). В настоящее время Европейское Экономическое Сообщество (ЕЭС) предлагает программу сертификации, предусматривающую производство посадочного материала винограда, свободного от следующих вредоносных для винограда вирусов: короткоузлия винограда *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (семейство *Comoviridae*, род *Nepovirus*, с икосаэдрическим типом симметрии, размер вирионов 28–30 нм), скручивания листьев винограда 1–7 серотипов (GLRaV 1–7, семейство *Closteroviridae*, род *Ampelovirus*, вирионы со спиральным типом симметрии, размер 1200–2200 × 12 нм); мраморности винограда (GFkV, семейство *Tymoviridae*, род *Maculavirus*, размер 28–30 нм), вирусов А и В винограда (GVA, GVB, семейство *Flexiviridae*, род *Vitivirus*,

размер  $800 \times 12$  нм), а также бороздчатости древесины Рупестрис (RSPaV), семейство *Flexiviridae*, род *Foveavirus*, размер вирионов  $800 \times 13$  нм). Одними из самых вредоносных являются вирусы короткоузлия винограда и скручивания листьев винограда, которые широко распространены во всех виноградарских районах мира и ведут к значительным потерям урожая и ухудшению его качества (Жуныко, 2006).

Вирус короткоузлия винограда (ВКВ) не был выявлен на винограде на ДВ России. Мы изучали его свойства, работая с украинскими изолятами этого вируса, поэтому считаем целесообразным представить результаты наших исследований по этому неповирусу, так как не исключаем возможности, что он со временем может быть обнаружен и в ДФО.

Вирионы вируса имеют изометрические частицы диаметром около 30 нм.

Симптомы заболевания очень варьируются и зависят от восприимчивости сорта и вирулентности вируса. Как правило, не все симптомы ВКВ проявляются одновременно на одном и том же пораженном кусте винограда. На листьях при первоначальном заражении появляются светло-зеленые извилистые линии, кольца и пятна. Позже мозаичность исчезает и появляются системные симптомы в виде асимметрии, редукции листьев, ненормального жилкования, широко открытых черешковых выемок, глубоких (или отсутствующих) боковых вырезов, заостренных и удлиненных зубчиков. На побегах наблюдаются двойные узлы, короткие междоузлия, ненормальная вильчатость, фасциации, зигзагообразный рост. Часто развитие пасынков придает пораженным растениям кустистый вид. Грозди мелкие, немногочисленные, с мелкими ягодами. У больных растений корни менее развиты, чем у здоровых. Кусты постепенно вырождаются и погибают. К поражаемым растениям относятся все виды винограда (*Vitis*) и их гибриды (Вердеревская, Маринеску, 1985).

ВКВ распространяется главным образом с посадочным материалом. Ранняя диагностика вируса позволяет быстро определить качество посадочного материала винограда. Естественный переносчик – нематода *Xiphinema index*. Имеются сообщения о переносе вируса нематодой *X. italiae*. Передача ВКВ семенами винограда не установлена, хотя вирус обнаружен в оболочке эндосперма семян. Но экспериментально вирус может передаваться семенами некоторых травянистых тест-растений.

ВКВ наносит значительный экономический ущерб виноградарству. Урожайность кустов снижается на 90–95%, пораженный виноград вырождается. Вирус влияет на укоренение черенков и приживаемость саженцев. Особенно велика вредоносность ВКВ в регионах, заселенных популяциями нематоды *X. index*.

ТТИ в соке составляет  $60\text{--}65$  °С, ПРС –  $10^{-3}\text{--}10^{-4}$ , ПСИ – 15–30 сут.

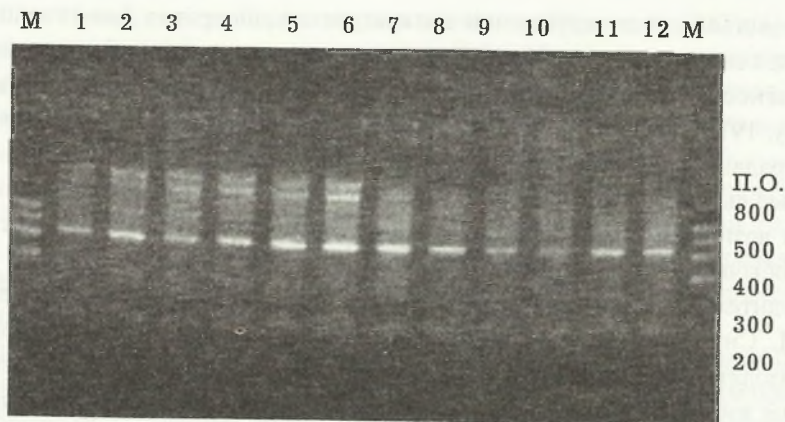
Распространен вирус повсеместно, где возделывается виноград. Выявлен в бывших республиках СССР в Украине и Молдове (Маринеску, 1973).

**Антигенные свойства и диагностика.** Исследовались антигенные взаимоотношения 5 изолятов ВКВ. 3 изолята были выявлены из винограда сортов Шасла белая, Пино серый и Рипариа × Руперстрис 3309. Они вызывали на листьях различные симптомы. 2 изолята выявлены из сортов винограда Сильванер и Алиготе, зараженных смешанной инфекцией – мраморностью, возбудителем хламидоподобных организмов и инфекционным хлорозом (Милкус и др., 1977).



В отечественной и зарубежной литературе неоднократно упоминалось о затруднениях, связанных с получением очищенного препарата для приготовления активных диагностических сывороток против многих вирусов, поражающих виноград (Маринеску, 1973; Милкус, 1982). Трудности прежде всего связаны с особенностями сока винограда: обилием дубильных веществ и высокой кислотностью сока (рН 3,0–3,5), которые вызывают быструю инактивацию вирусов во время растирания тканей. Поэтому и возникают трудности при механической инокуляции травянистых тест-растений, обычно используемых в дальнейшем для очистки вируса.

Возбудитель ВКВ успешно был перенесен на *Ch. amaranticolor* Coste et Reyn. и *Ch. album* L. Симптомы, которые возникали на тест-растениях после инокуляции изучаемыми изолятами, были идентичны и проявлялись в виде крапчатости на листьях и посветления жилок. Заражение было системным. Для приготовления инокулята брали молодые листья винограда с ярко выраженными симптомами заболевания, которые гомогенизировались в присутствии 0,1 М трис-буфера, содержащего антиоксиданты. Относительно чистые препараты получали по методу Taylor и Hewitt (1964), их вводили в качестве антигена по комбинированной схеме иммунизации, включающей в/м и в/в инъекции. Через 60 дней после последней иммунизации проводили реиммунизацию. Титровали полученные антисыворотки в РДД, раствор агара (0,8%) готовили на 0,01 М фосфатном буфере, рН 6,0. В реакциях использовали свежий сок зараженных растений, а в качестве контроля – сок здоровых растений. При равных условиях получения очищенного препарата и поликлональных антисывороток результаты титрования отличались. К изоляту, выделенному из винограда сорта Шасла белая, была приготовлена самая активная антисыворотка с титром 1:128, к изолятам из сортов Пино серый, Алиготе и Сильванер – с титром 1:32, к изоляту из сорта Рипариа × Рупестрис 3309 – 1:8. При реиммунизации титры антисывороток на 1–2 порядка были выше. Изучение антигенных взаимоотношений между исследуемыми изолятами проводили в перекрестных реакциях РДД. Каждая антисыворотка реагировала со всеми изолятами ВКВ. Это свидетельствовало о близком антигенном родстве между ними. Антисыворотки низкого титра, естественно, были менее активны. Возможно, в них присутствуют перекрестно реагирующие антитела, но концентрация их слишком мала. Поэтому мы считаем, что метод перекрестного титрования не позволяет достаточно четко дифференцировать эпитопы, специфичные к определенному изоляту. Для выяснения возможных различий между изолятами наряду с перекрестной реакцией мы применили метод внутригелевой адсорбции. Результаты подтвердили наше предположение, что исследуемые изоляты украинского штамма ВКВ имели идентичные эпитопы капсидных белков. На основании проведенных иммунохимических исследований можно заключить, что изучаемые изоляты ВКВ, вызывающие на винограде различные симптомы в виде мозаик, проявили близкое антигенное родство и являются украинским штаммом вируса. Антисыворотка, полученная О. Косаковской из Молдовы, дала возможность исследователю выявлять ВКВ непосредственно в соке винограда. С помощью специфической антисыворотки показано, что молдавские изоляты ВКВ



**Рис. 40.** Оптимизация ОТ-ПЦР для выявления ВКВ (по: И.Д. Жунько, 2006): 1, 2 – Т отж = 53 °С, 1,3 мМ Mg<sup>++</sup>; 3, 4 – Т отж = 53 °С, 1,7 мМ Mg<sup>++</sup>; 5, 6 – Т отж = 53 °С, 2,0 мМ Mg<sup>++</sup>; 7, 8 – Т отж = 61 °С, 1,3 мМ Mg<sup>++</sup>; 9, 10 – Т отж = 61 °С, 1,7 мМ Mg<sup>++</sup>; 11, 12 – Т отж = 61 °С, 2,0 мМ Mg<sup>++</sup>; М – маркеры молекулярной массы

идентичны между собой и французским изолятом с симптомами желтой мозаики, но находятся в далеком антигенном родстве с ВМРс (Вердеревская, Маринеску, 1985).

В настоящее время для диагностики вирусов, поражающих виноград, применяются высокочувствительные иммунохимические и молекулярно-биологические методы диагностики ИФА и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В 2002–2005 гг. на юге Украины наблюдалась широкая распространенность вирусов на виноградниках в посадочном материале, полученном из Молдовы. И.Д. Жунько применила для диагностики ВКВ твердофазный двойной сэндвич-метод ИФА с белком А, используя тест-системы фирмы «Agritest» (Италия) и ОТ-ПЦР (Жунько, 2006). При 1,3 мМ Mg<sup>++</sup> и температуре отжига (Т<sub>отж</sub>) 61 °С количество амплифицированных фрагментов было достаточным для четкой визуализации вируса в агарозном геле (рис. 40).

### Вирус кольцевой пятнистости малины *Raspberry ringspot virus*

Вирус кольцевой пятнистости малины (ВКПМ) впервые описал на малине С.Н. Кадман (Cadman, 1963). На ДВ России его выявила из растений смородины и малины О.Г. Гордейчук (Gordeichuk et al., 1977). На растениях ряда сортов малины авторы наблюдали яркую крапчатость, мозаику, кольца, хлоротичные пятна. Наиболее ярко симптомы проявлялись на однолетнем приросте и на плодоносящих побегах. Растения с подобными симптомами обнаружены и у диких видов малины *Rubus sachalinensis* Lev.

На листьях смородины ранней весной эти исследователи отмечали симптомы в виде единичных желтых колец. Позднее появлялись листья с мозаикой в виде желтоватых разводов. Молодые листья таких растений были слегка морщинистыми и скрученными.



Вирионы имели сферическую форму и размер в диаметре 30 нм.

Вирус легко передавался механически, но более эффективная передача была, когда использовали для гомогенизации листьев фосфатный буфер с антиоксидантами. Круг травянистых растений-хозяев довольно широк. Наиболее специфические симптомы проявления вирусной инфекции при заражении ВКПМ отмечены у растений махорки – кольца с «выгравированным» ободком. На инокулированных листьях фасоли сорта Пинто на 4–5-й день после инокуляции появлялись коричневые некрозы с серой точкой в центре, на листьях петунии – характерная для вируса реакция в виде колец и посветления тканей. По литературным данным, вирус поражает и нарциссы. Поражение обычно бессимптомное.

Вирус передавался семенами малины сорта Желтоплодная. По литературным данным, переносится нематодами *Longidorus* и *Xiphinera* sp. (Билай и др., 1988).

ТТИ – 68 °С, ПРС – 0<sup>-3</sup>, ПСИ – 15–16 дней.

Вирус оказался неплохим иммуногеном. Была получена антисыворотка с титром 1:512 по результатам капельной агглютинации, которая надежно выявляла вирус в больных растениях. Для более четкой идентификации вируса О.Г. Гордейчук с соавт. (1977) использовала антисыворотку к ВКПМ, полученную от доктора Р. Стейс-Смита, которая реагировала не только с изолятом из малины, но и с соком растений смородины, зараженной изучаемым неповирусом.

Установлено естественное заражение вирусом в природе более 15 семейств диких и культурных двудольных растений. Вирус помимо смородины и малины поражает землянику, красную смородину, вишню, черешню, виноград, обнаружен на многих других сельскохозяйственных растениях. Распространяется вегетативно с посадочным материалом, переносится пылью, семенами, нематодами.

Встречается вирус в Европе, Турции, России.

### Вирус кольцевой пятнистости табака *Tobacco ringspot virus*

Вирус кольцевой пятнистости табака (ВКПТ) – первый обнаруженный в бывшем СССР неповирус. Вирионы сферической формы, размер 25–29 нм.

Вирус поражает 246 видов растений из 54 семейств (Franki, Natta., 1977). Среди возделываемых культурных растений вирусом поражаются: табак, шпинат, свекла, огурцы, арбуз, тыква, дыня, табак, фасоль, вигна, соя, горох, баклажан, томат, картофель. Заражаются и многие декоративные культуры: цинния, астра, ноготки, донник, тагетес, гладиолус, тюльпан и др., а также дикорастущий ягодный кустарник голубика, плодовые, виноград. Первые симптомы заболевания при искусственном заражении табака сорта Уайт Барлей проявляются в виде нескольких одинарных четко очерченных некротических колец с пятном в центре, которые через несколько суток становятся белыми или коричневыми. В дальнейшем кольцевая пятнистость приобретает концентрическую форму. Далее развиваются системные симптомы, больше относящиеся к средней и крупным боковым жилкам листа. На листьях, появившихся позже, симптомы могут отсутствовать либо наблюдаться только на верхушке. Листья

растений с замаскированными симптомами несколько утолщены и более кожисты, чем у здоровых растений. На листьях мари амарантоцветной вирус вызывает некротические локальные пятна, на вигне китайской *Vigna sinensis* – сплошные некротические пятна на листьях, системный некроз всего растения и гибель растения после инокуляции на 9–10-й день.

ТТИ – 60 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 3 сут (Билай и др., 1988).

Гладиолусный штамм ВКПТ имеет ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ , ПСИ – 8–9 сут (Bridgmon, Walker, 1952; цит. по: Козицкий, 1975).

Передается вирус механической инокуляцией сока, в природе распространяется нематодой *Xiphinema* sp. (например, на тюльпане), нимфами *Trips tabaci* (на сое), клещом *Tetranychus* sp. От остальных неповирусов отличается тем, что не может переноситься жуками, отдельными видами клещей, трипсами и прямокрылками (*Epithrix hirtipennis*, *Trips tabasi*, *Melanopus differentialis*, *Tettigiria viridissima*).

Вирус зарегистрирован в районах возделывания табака в Северной Америке, Европе и в местах выращивания декоративных, бобовых и овощных культур – в бывшей Прибалтике и России (ДФО).

В 1941 г в США (штат Индиана) на сое впервые было отмечено заболевание, вызываемое ВКПТ, получившее название некроза верхушки стебля сои (болезнь бутонов) (Allington, 1945). Верхушечная почка больного растения буреет, становится сухой и хрупкой. Лист под почкой покрывается ржавыми пятнами, задерживается рост, иногда наблюдается побурение внутри стебля в области узлов. Вирус передавался инокуляцией сока больных растений сои и в очень небольшом проценте семенами (Fulton et al., 1962). Описанное заболевание получило широкое распространение в центральных и западных районах США и Канаде. Особенно большие потери урожая сои на десятках тысяч гектаров это заболевание вызвало в 1943–1947 и 1955–1957 гг.

На Дальнем Востоке ВКПТ, или как автор назвала его по проявлению симптомов – некроз верхушки растений сои, впервые был обнаружен на сое (Поливанова, 1971). Вирус, заражая молодое растение в начальный период развития, вызывал его гибель, на более поздних стадиях способствовал образованию боковых побегов, поэтому развившиеся растения были слабые, отставали в росте и развитии от здоровых. Симптомы заболевания, вызываемые ВКПТ на растениях сои, выглядели следующим образом: растения были сильно угнетены и отставали в росте от здоровых растений, листья были светло-желтыми с точечными коричневыми некрозами, окруженными хлоротичными кольцами. Позднее появлялся хлороз между жилками. Доли листа были вытянуты, отмечена пролиферация цветков. Бобы не развивались. На тройчатых листьях отмечалась пятнистость, пятна просвечивались. Иногда наблюдался некроз верхушечной почки, а на листьях растений сои появлялись мелкие некрозы, пятнистость, листья становились кожистыми. Вирус передавался через семена и легко механически на табак, горох сорта Аляска и вигну. Дальневосточный изолят ВКПТ был очень чувствителен к внешним условиям и при повышенных температурах (28–30 °С) видимых симптомов не проявлял. При инокуляции растений *N. tabacum* через 3–4 дня отмечали появление точечных некрозов, которые затем окружались кольцевыми ли-



ниями, позже возникал рисунок вдоль жилок. Растения некоторых сортов вигны китайской *Vigna sinensis* (Torn.) реагировали по-разному: черносемянные (типа Black) образовывали некрозы с бордовым кольцом; красносемянные сорта Гибридная 7 через 3 дня – просвечивающиеся пятна и посветление жилок, затем появлялись кольцевые некрозы.

В электронном микроскопе наблюдались сферические частицы диаметром 28 нм.

Нам удалось получить пробную партию антисыворотки к частично очищенному препарату вируса. Титр специфических антител в КА был невысок – 1:8, антисыворотка реагировала со здоровыми белками в разведении 1:2, но при ее разведении 1:8 наблюдали только специфическую реакцию антител с гомологичным вирусом.

ТТИ – 55–60 °С, ПРС – 10<sup>-4</sup>, ПСИ – 3 сут, при пониженной температуре вирус сохранялся до 22 мес (Проценко, 1966).

Интересные данные получили фитовирусологи из Узбекистана (Горбунова и др., 1971). Искусственное заражение сои ВКПТ показало высокую восприимчивость к вирусу при механической инокуляции, количество зараженных растений достигало 80–90%. Симптомы заболевания проявлялись на 5–7-й день после инокуляции. На инокулированных листьях образовывались хлоротичные пятна, отрастающие листья были желтого цвета с мелкими некротическими ржавыми пятнами. Отмечалось угнетение роста больных растений, наблюдалось измельчение листьев и более сильное их опушение. Но наиболее характерный симптом для ВКПТ на сое – засыхание и опадение верхушечной почки. Этот признак отмечен и американскими исследователями как наиболее типичный для этого вируса. Заболевание, вызываемое им, получило название «опадение почек». Наиболее восприимчива соя к этому вирусу в фазе 2–4 листьев, что приводит к резкому угнетению роста растения и большим потерям урожая (до 65%). Заражение в более поздние сроки развития (бутонизация, цветение) вызывает более слабую степень проявления заболевания и приводит к меньшему снижению урожая (до 35%).

### Вирус кольцевой пятнистости томата *Tomato ringspot virus*

Впервые вирус кольцевой пятнистости томата (ВКПТо) выявлен из растений томатов в 1946 г. (Smith, 1946; цит. по: Вердеревская, Маринеску, 1985). Поражает ВКПТо широкий круг растений, среди которых преобладают дикорастущие виды.

На ДВ России вирус идентифицирован на растениях малины и смородины (Gordeichuk et al., 1977). На растениях малины исследователи наблюдали желтые пятна на листьях, которые по мере развития растения сливались, образуя ярко-желтые участки ткани. Наиболее ярко симптомы проявлялись весной или на вновь отрастающих листьях. На листьях смородины отмечены более мелкие светлые пятна, иногда кольца.

Передача вируса прививкой подтвердилась спустя 8 мес. На листьях подвоя на *Rubus occidentalis* появились симптомы – мозаика, пятна и кольца светло-зеленого цвета, а на *Rubus dicuscha* – светлые пятна возле крупных жилок, морщинистость.

На растениях табака, петунии, томата, фасоли св. Pinto и др. при заражении ВКПТо отмечены характерные для вируса симптомы, описанные в литературе. Так, на петунии наблюдали отчетливые кольца с бурым, реже черным ободком, которые образовывались весной и осенью. В летний период чаще проявлялся некроз центральной жилки с последующим засыханием всего листа.

ТТИ – 57–58 °С, ПСИ – 36–48 ч, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ , что соответствует литературным данным: ТТИ – 58 °С, ПСИ – 2 сут, ПРС –  $10^{-3}$  (Вердеревская, Маринеску, 1985; Билай и др. 1988).

Вирионы имели сферическую форму, размер в диаметре 28 нм.

В клетках зараженных вирусом растений табака и петунии обнаружены вирусные включения – мелкие многоугольной формы пластинки размером 3–10 мк. Их наблюдали в моменты проявления симптомов на листьях (желтые пятна и кольца) и исчезали по мере ослабления симптомов и старения растения. При окрашивании включений была показана их нуклеопротеидная природа.

Дальневосточный изолят ВКПТо реагировал с антисывороткой, специфичной к вирусу, которая была получена от доктора Р. Стейс-Смита из Канады.

Вирус заражал растения более 35 семейств. В природе он поражает декоративные, древесные и кустарниковые растения. Вызывает мозаичность и кольцевые пятнистости на малине, ежевике, пожелтение жилок листа на винограде, мозаичное пожелтение почек персика, рашпилевидность листьев черешни.

Распространяется ВКПТо с посадочным материалом, в природе переносится нематодами *Xiphinema americanum* и *X. rivesi*.

Массово поражая древесные и кустарниковые растения, вирус наносит большой экономический ущерб таким странам, как США и Канада, где ареал его распространения тесно связан с наличием переносчика. Помимо этих стран вирус зарегистрирован в Италии, Австралии, Новой Зеландии. В бывшем СССР вирус зарегистрирован в Молдове и на Дальнем Востоке.

В насто  
родов и объе  
что составляе  
семейства по  
Shukla, 199  
ется вирусом  
и двудольные  
желтой моза  
представител  
У-вируса карт  
например вир  
ное количество

Назван  
mosaic virus  
лозияна типо  
и пятнистость  
семейства *Ru*  
жак различн  
тенневодства  
Впервые  
У-вируса карт  
(Huttinga, M  
основных чел  
возможных ч  
типичным  
ли главным  
частиц, тип  
передачи, гл  
русной инфо

Начина  
следования



## Семейство Potyviridae

В настоящее время это самое многочисленное семейство. Оно состоит из 6 родов и объединяет более 200 истинных и возможных видов (Fauguet et al., 2005), что составляет около 40 % всех известных фитопатогенных вирусов. Вирусы этого семейства поражают более тысячи видов растений 369 родов и 53 семейств (Ward, Shukla, 1991). Они заражают как однодольные растения (например, пшеница поражается вирусом штриховатой мозаики пшеницы, пырей – вирусом мозаики пырея), так и двудольные (свекла поражается вирусом мозаики свеклы; фасоль, горох – вирусом желтой мозаики фасоли; редис, лоба – вирусом мозаики турнепса и т.д.). Некоторые представители семейства (вирус мозаики турнепса, вирус желтой мозаики цуккини, Y-вирус картофеля и др.) имеют широкий круг восприимчивых растений. Другие же, например вирус мозаики арбуза 1, A-вирус картофеля, способны заражать ограниченное количество видов растений.

### Таксономическая структура семейства *Potyviridae*

#### Роды:

*Potyvirus*    *Macluravirus*  
*Rymovirus*   *Ipomovirus*  
*Bymovirus*   *Tritimovirus*

Название родов происходит от типовых видов, например *rymo* – от *Ryegrass mosaic virus*; *bymo* – от *Barley yellow mosaic virus*; *maclura* – от *Maclura*, растения-хозяина типового вида вируса рода; *tritimo* – от латинского названия пшеницы *triticum* и пятистость *mosaic*. Несколько подробнее остановимся на истории формирования семейства *Potyviridae*, виды которого широко распространены по всему миру, поражая различные сельскохозяйственные растения и принося этим огромный вред растениеводству.

Впервые вирусы *Potyvirus*, получившие название от типового представителя Y-вируса картофеля *Potato virus Y* были объединены в отдельную группу в 1974 г. (Huttinga, Mosch, 1974). Позже Р. Метьюз (Matthews, 1979; 1982) включил в нее 35 основных членов и 38 возможных представителей, а в 1982 г. – уже 48 типичных и 66 возможных членов. Спустя 3 года группа пополнилась новыми представителями, как типичными, так и возможными (Francki et al., 1985). Вирусы в эту группу объединяли главным образом по фенотипическим признакам: морфология и размер вирусных частиц, тип симметрии, круг растений-хозяев, характер симптомов на них, способы передачи, гистологические и цитологические изменения растения под влиянием вирусной инфекции, антигенные свойства капсидных белков и др.

Начиная с 80-х годов, когда широко стали внедряться молекулярные методы исследований генома вирусов, полученные с их помощью данные становятся опреде-

ляющими наряду с классическими методами идентификации не только известных, но и вновь выявленных вирусов и их штаммов. К молекулярным критериям относят: тип нуклеиновой кислоты, количество ее нитей и фрагментов, характер распределения фрагментов генома в вирионах, структуру генома, количество и расположение в нем транслируемых участков (ОРС), особенности концевой структуры молекул нуклеиновой кислоты, количество и м.м. полипептидов вириона, генную последовательность, гибридизацию нуклеиновых кислот, последовательность белков оболочки, пептидные профили и т. д.

Накопленные к середине 90-х годов данные позволили разделить все выявленные потивирусы на 4 рода, содержащие одноцепочечный несегментированный геном (+)РНК, которые вошли во вновь образованное семейство *Potyviridae*. Роды получили название бимо- (*Bymo-*), римо- (*Rymo-*), ипомо- (*Ipomo-*) и потивирусы (*Potyvirus*). К началу третьего тысячелетия в семейство включили еще два рода – тритимо- (*Tritimo-*) и маклуравirus (*Macluravirus*). Причем из классических признаков, позволяющих разделить вирусы семейства на роды, не второстепенную роль отвели виду переносчика. Известно, что в природе передача вирусов этого семейства осуществляется главным образом с помощью насекомых (тлей, клещей), грибов и белокрылки. Общим для всех видов переносчиков является то, что они повреждают клетки обычно во время питания на растениях, имея, таким образом, возможность получать вирус из зараженного растения и заразить им здоровые. Они также сохраняют вирус в инфекционной форме от момента его приобретения до передачи здоровому растению. Ответственным за инкапсидирование вирусной РНК является структурный белок, названный хелперным компонентом, или фактором переноса НС-Pro. Он играет определяющую роль в специфичности переносчика, особенно в отношении вирусов, которые не размножаются в переносчике. Этот белок обнаруживается в тканях зараженных растений и является продуктом вирусного генома (Thornbury, Pirone, 1977). Белок имеет м.м. 100–200 кДа и является многофункциональным. N-концевая часть молекулы отвечает за передачу потивирусов тлями (Govier et al., 1977). Вместе с тем имеются сообщения о точечных мутациях в С-концевой области, приводящие к снижению эффективности передачи инфекции тлями (Granier et al., 1993). То есть векторной передачей видов рода *Potyvirus* управляет несколько сайтов НС-Pro – «хелперный помощник – протеиназа». Капсидный белок, таким образом, помимо хорошо известной защитной функции нуклеиновой кислоты обладает и важной ролью в процессе передачи вируса переносчиками. Как правило, вирус, имеющий переносчика одного таксономического рода, не переносится насекомыми-переносчиками, специфичными для другого. Хотя есть исключения: так вирус кольцевой пятнистости табака передается нематодами, трипсами и паутиными клещами (Метьюз, 1973).

**Свойства вирионов. Морфология.** Вирусные частицы семейства *Potyviridae* представляют собой извилистые нити без наружной оболочки с диаметром 11–15 нм и шагом спирали – 3,4 нм. Вирусы родов *Poty-*, *Rymo-*, *Maclura-*, *Ipomo-* и *Tritimovirus* имеют модалную длину частиц 650–900 нм. Только нитевидные частицы вирусов рода *Bymovirus* бывают двух видов с модалной длиной 250–300 и 500–600 нм.



**Физико-химические и физические свойства.** Коэффициент седиментации видов семейства  $S_{20,W}$  – около 150–160 S. Вирусы родов *Poty-*, *Рymo-*, *Maclura-*, *Ipomo-* и *Tritimovirus* имеют плавучую плотность в CsCl – 1,31 г/см<sup>3</sup>, а *Vymovirus* – 1,29 г/см<sup>3</sup> (Hari, 1981).

**Нуклеиновая кислота.** Вирионы вирусов родов *Poty-*, *Рymo-*, *Maclura-*, *Ipomo-* и *Tritimovirus* содержат одну молекулу линейной (+)РНК длиной 8,5–10,0 т.п.о. На 5'-конце содержится ковалентно связанный белок VPg (24 кДа). На 3'-конце располагается полиадениловая последовательность поли(А) длиной 20–160 нт. РНК – 3,0–3,5 МДа. Геном вирусов рода *Vymovirus* состоит из двух частей (+)онРНК: РНК 1 длиной 7,90 т.п.о. (м.м. 2,6 МДа) и РНК 2 длиной 4,56 т.п.о. (м.м. 1,5 МДа). Они имеют поли(А) на 3'-конце. Бимовирусная РНК 2 кодирует белок с м.м. 28 кДа, который содержит аминокислотные последовательности, гомологичные с потивирусными протеазами хелпер-компонента.

**Белки.** Капсид вирусов семейства *Potyviridae* состоит из мономеров с м.м. 30–47 кДа,  $E^{0,1\%}_{260} = 2,4–2,7$ . Полипротеин, транслируемый с геномной РНК, расщепляется на несколько неструктурных белков, некоторые из них образуют внутриклеточные включения. По такому критерию, как аминокислотная последовательность в капсидном белке, доказано родство всех шести родов семейства *Potyviridae*. Причем процент идентичности аминокислотных последовательностей находится в диапазоне 25–50 % (Shukla, Ward, 1988). Оказалось, что вирусы, переносимые тлями и относящиеся к роду потивирусов, имеют между собой наибольший процент гомологии аминокислотной последовательности, которая соответствует 50 %. Между родами римо- и потивирусов процент гомологии 25–30 %. При этом главные различия обнаруживаются в длине и последовательности их N-концов, в то время как С-терминальные части молекулы сходны (Friedt, 1995).

Вирусы семейства в основном лабильны, обладают тенденцией к агрегации и фрагментации в процессе получения очищенного препарата, что ведет к большим потерям вируса при его очистке.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

**Организация генома и репликация.** Геномные РНК содержат единственную ОРС, включающую всю генетическую информацию. Она экспрессируется первоначально в виде одного полипротеина, который в результате протеолитического процессинга вирусными протеиназами образует белки отдельных генов.

**Антигенные свойства.** Капсидные белки видов семейства – умеренные иммуногены. Между штаммами одного вида и отдельными видами одного семейства, а также между видами родов семейства *Potyviridae* отмечено антигенное родство, которое выражается в различной степени. Исследованы иммуногенные свойства N-концевой области белка вируса гравировки табака и показано, что N-концевой фрагмент экспонирован наружу вирусной частицы (Dougherty et al., 1985; Allison et al., 1986). Аналогичные данные получены А. Шуклой с соавт. (Shukla et al., 1988). По их данным, в результате протеолиза трипсином у 6 потивирусов (желтой мозаики

фасоли, Y-вируса картофеля, пожелтения жилок клевера, мозаики арбуза 2, вируса мозаики реговика униоловидного, вируса одревесневения плодов страстоцвета) обнаружены N- и C-концевые области белков, экспонированные наружу вирусных частиц. N-концевые области содержали 30–67, а C-концевые – 18–20 аминокислотных остатков. Авторами показано, что центральные части вирусной частицы, состоящие из 216 или 218 аминокислотных остатков, сохраняют инфекционность, но с помощью поликлональных антител выявлено, что они не содержат вирусспецифические эпитопы. Степень гомологии последовательностей нуклеотидов в участке генома РНК изучаемых потивирусов высока (до 70 %). На основании последовательностей белков оболочки построено филогенетическое древо потивирусов (Quemada et al., 1990). Следовательно, данные о последовательности аминокислотных остатков полипептидной цепи вирионов играют определяющую роль при идентификации вирусов.

Многие авторы отмечают большую вариабельность размеров N-концевых участков белков потивирусов, в то время как для C-концевых областей характерны отличия лишь в 1–2 аминокислотных остатках (Allison et al., 1986; Shukla et al., 1986, 1988, 1989). Эти авторы показали, что N-концевые участки содержат наиболее иммунодоманентные области в частицах потивирусов. Причем ими отмечено, что эпитопы капсидных белков локализованы в N-концевой области, тогда как родоспецифические эпитопы содержатся в области трипсиноустойчивого основного белка (свободного от N- и C- концов). Данные о локализации видо- и родоспецифических эпитопов позволяют исследовать топографию белков в капсиде, служат источником создания синтетических антигенов и генноинженерных антисывороток. Таким образом, подобные исследования показывают, что эти результаты могут быть использованы как один из критериев при идентификации вида и отнесения его к роду потивирусов (Hiebert et al., 1987; Shukla, Ward, 1988).

**Биологические свойства.** *Круг растений-хозяев.* Он у вирусов семейства может быть узкий (например, римо- и бимовирусы поражают только злаковые культуры), умеренный и широкий (например, потивирусы). Инфицированные растения обычно реагируют развитием хлоротичной мозаики или крапчатости на листьях, многие вирусы вызывают пестролепестность у декоративных культур (например, тюльпанов), деформацию плодов и семян, что в итоге значительно снижает урожай и качество продукции.

ТТИ для большинства вирусов семейства находится в пределах 50–70 °С, но чаще всего вирусы инактивируются при 55–60 °С. Однако встречаются вирусы с более низкой ТТИ, например, вирус шарки (оспы) сливы инактивируется при 51–54 °С, ПСИ от 1 до 50 сут, хотя у большинства вирусов он от 2 до 4 сут (Hollings, Brunt, 1981).

**Вирусные включения.** Отличительным признаком вирусов семейства *Potyviridae* являются индуцированные вирусами цилиндрические и конические цитоплазматические включения, имеющие вид спиц колеса «pinwheels» в поперечных срезах. Они были обнаружены с помощью электронного микроскопа в основном в цитоплазме и имели м.м. 67–70 кДа (Mejia et al., 1985). Выявлен и другой вид включений в виде аморфных образований, обозначенных белком HC-Pro м.м. 51–52 кДа (Dougherty, Hiebert, 1980). С помощью светового микроскопа легко можно обнаружить ядерные



или околядерные вирусные включения (Х-тела), образованные неструктурными белками Nia и Nib м.м. 49 и 54–56 кДа соответственно (Gotz, Huth, Maiss, 1995). Белок включений (м.м. 70 кДа) не имеет антигенного родства с вирусным белком оболочки, но кодируется вирусным геномом. Причем тип вирусного включения и особенности его строения и локализация в клетке являются характерными признаками вируса и часто используются для его идентификации. Антисыворотки к белкам цитоплазматических включений вирусов перистой крапчатости батата, суровой мозаики ириса, желтой мозаики фасоли, пожелтения жилок клевера, мозаики турнепса использовали при иммуноблоттинге белков. Отмечены перекрестные реакции этих сывороток с белками цитоплазматических включений 17 потивирусов. На этом основании был сделан вывод, что белки вирусных включений и белки оболочки видов семейства потивирида имеют вирусспецифические внешние эпитопы и сохранные внутренние последовательности (Hammond J.H., Hammond R.V., 1989).

**Передача.** Большинство представителей семейства легко передаются экспериментально при механической инокуляции. Широкому распространению среди культурных и дикорастущих растений способствуют тли многочисленных видов. Особенностью представителей данного семейства является зависимость векторной передачи от белка, названного хелперным компонентом (или фактором переноса). Он обнаруживается в тканях зараженных растений и является продуктом вирусного генома (Govier, Kassanis, 1974; Thonbury, Pirone, 1983). Вирусы родов *Poty-* и *Macluravirus* передаются тлями непersistентным способом. При этом, как мы обсудили выше, у вирусов рода *Potyvirus* необходимо участие хелпер-компонента и специфического аминокислотного триплета белка оболочки. Вирусы родов *Rymovirus* и *Tritimovirus* передаются клещами-эриофидами, *Vymovirus* – грибами, а *Ipomovirus* – белокрылками. Отдельные вирусы, в основном те, что поражают бобовые культуры, передаются семенами больных растений (вирусы обыкновенной мозаики фасоли, мозаики сои, мозаики коровьего гороха, желтой мозаики фасоли и др.). У растений гороха, бобов, белого клевера, фасоли, люпина желтого и белого, зараженных вирусом желтой мозаики фасоли, семенная передача составляет 3–6% (Bos, 1970). Однако данных по семенной передаче для большинства других вирусов семейства нет. Резерваторами для некоторых вирусов могут быть корнеплоды сахарной свеклы, клубни картофеля, георгинов, луковицы тюльпана, гладиолуса, лука и др.

Остановимся на краткой характеристике каждого из шести родов семейства *Potyviridae*. Описание начнем с рода, который довольно существенно отличается по своим характеристикам от других пяти родов этого семейства.

### Род *Vymovirus*

Вирусы этого рода, как было отмечено выше, имеют гибкие нити длиной 250–300 нм и 500–650 нм и шириной 13 нм. Вирионы содержат две молекулы линейной (+)онРНК, бимовирусам свойственна некоторая гомология последовательностей. Ген единственного белка оболочки (м.м. 28,5–33,0 кДа) локализован в 3'-проксимальном

участке РНК 1. Обе молекулы геномной РНК транслируются в полипротеины, из них при протеолитическом процессинге образуются функциональные белки. Бимовирусы – умеренные иммуногены, некоторые имеют антигенное родство капсидных белков. В цитоплазме инфицированных клеток бимовирусы вызывают образование цилиндрических включений типа «pinwheels» и мембранных сетчатых структур. Ядерных включений они не образуют. Бимовирусы передаются грибом полимикса злаков *Polymyxa graminis* (*Pasmidiophorales*) (Steinfiss, 1995). Зооспоры грибов, поражая корни растений, выполняли роль переносчиков вирусов, распространяемых через почву. Для бимовирусов характерен узкий круг растений-хозяев среди злаковых растений. Экспериментально вирусы передаются механической инокуляцией сока, прививкой, при контакте растений, но не передаются семенами и пыльцой. В этот род включены главным образом вирусы, поражающие злаки: вирус желтой мозаики ячменя (ВЖМЯ) *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) – типовой вид; вирус слабой мозаики ячменя (ВСМЯ) *Barley mild mosaic virus* (BaMMV); вирус веретенновидной полосатой мозаики пшеницы (ВВПМП) *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV); вирус желтой мозаики пшеницы (ВЖМП) *Wheat yellow mosaic virus* (WYMV); вирус мозаики овса (ВМО) *Oat mosaic virus* (OMV); вирус некротической мозаики риса (ВНМР) *Rice necrotic mosaic virus* (RNMV).

### Род *Macluravirus*

Вирионы нитевидные, более прямые или несколько волнистые, модалная длина около 665 нм, седиментирует одним компонентом с  $S_{20,w} - 156 S$ . Плавающая плотность в CsCl – 1,31 г/см<sup>3</sup>. Вирионы содержат одну молекулу линейной (+)онРНК и один капсидный белок с м.м. 40,0 кДа.

Передаются маклуравirusы тлями, механически и прививкой. Не передаются при контакте растений, семенами и пыльцой.

В цитоплазме клеток растений они образуют Х-тела и включения типа «pinwheels».

Род представлен двумя видами: вирусом мозаики маклюры (ВММ) *Maclura mosaic virus* (MacMV) – типовой вид и латентным вирусом нарцисса (ЛВН) *Narcissus latent virus* (NLV).

### Род *Ipomovirus*

Вирусы имеют гибкие нити размером 750–815 нм, содержат одну молекулу линейной (+)онРНК и один вид капсидного белка с м.м. 35,3–37,7 кДа. Вирионы локализируются в цитоплазме, образуя внутриклеточные включения типа «pinwheels». Вирусы встречаются обычно в странах с жарким климатом (например в Африке, на Тайване) и передаются белокрылками, в частности *Demissia tabasi* (*Aleyrodidae*). Взаимодействие вируса с переносчиком почти такое же, как вируса с тлей. Они питаются главным



образом соком из флоэмы, поэтому личинки являются оседлыми, прикрепленными. Белокрылки сохраняют способность передавать вирус на протяжении всей своей жизни. Самки заражают растения вдвое эффективнее, чем самцы. Инфицировать вирусом и передавать его способны как нимфы, так и взрослые насекомые. Виды рода ипомовирусов помимо белокрылки могут передаваться экспериментально механической инокуляцией и прививкой, семенами они не передаются. Род ипомовирусов представлен двумя видами: вирусом слабой крапчатости батата (ВСКБ) *Sweet potato mild mottle virus (SPMMV)* – типовой вид и вирусом желтой карликовости батата *Sweet potato yellow dwarf virus (SPYDV)*.

### Род *Rymovirus*

Вирусы этого рода имеют гибкие нити длиной 690–720 нм и шириной 11–15 нм, плавучая плотность в CsCl – 1,33 г/см<sup>3</sup>,  $S_{20,w}$  – 165–166 S, содержат одну молекулу линейной (+)оННК длиной 8,2 т.п.о. (м.м. 2,7 кДа) с поли(А) на 3'-конце. Вирионы имеют один капсидный белок с м.м. 29,2 кДа.

Спектр растений-хозяев у римовирусов довольно ограничен. Римовирусы, как и бимовирусы, главным образом поражают растения из семейства *Poaceae*. Это в основном озимые и яровые злаковые культуры, однолетние и многолетние злаковые травы. Некоторые виды этого рода: вирус мозаики райграсса (ВМРай) *Ryegrass mosaic virus (RGMV)* – типовой вид; вирус мозаики пырея (ВМП) *Agropyron mosaic virus (AgMV)*; вирус мозаики ячменя (ВМЯ) *Hordeum mosaic virus (HoMV)*; вирус некротической крапчатости овса (ВНКО) *Oat necrotic mottle virus (ONMV)*; вирус крапчатости *Spartina* (ВКС) *Spartina mottle virus (SpMV)* – предполагаемый вид рода.

Римовирусы передаются экспериментально механической инокуляцией, семенами и клещами семейства *Eryiophyidae*. Четырехногие клещи этого семейства – крайне специализированные паразиты растений. Клещ *Aceria tulipae* передает ВМЯ, другой клещ *Abacarus hystrix* – ВМП. Они питаются, прокалывая стилетами растительные клетки и высасывая их содержимое. Клещи способствуют проникновению вируса через почки, листья и т.д. От растения к растению клещи распространяются ветром.

Римовирусы поражают растения из семейства *Graminae*, являются умеренными иммуногенами, эпитопы капсидных белков имеют между собой большой процент идентичности. Показано антигенное родство между капсидными белками римовирусов ВМРай, ВМП и ВМЯ и типовым представителем потивирусов – Y-вирусом картофеля (Schubert et al., 1995). Эти исследователи изучали аминокислотную последовательность белка оболочки Y-вируса картофеля и ВМРай. По их данным, N-конец центрального участка капсидного белка имеет приблизительно 60 аминокислот, и этот участок цепи не родственен для этих вирусов.

### Род *Tritimovirus*

Выделен из рода римовирусов в связи с отличиями в последовательности генов, а также в видах клещей-переносчиков. Эти вирусы имеют нитевидные вирионы дли-

ной 700 нм, коэффициент седиментации  $S_{20,W} - 165 S$ . Они содержат одну молекулу линейной (+)онРНК длиной 8,5 т.п.о. с поли(А) на 3'-конце и один вид капсидного белка с м.м. 47,0 кДа. Передаются тритимовирусы клещем *Aceria tulipae* (семейство *Eriophyidae*). Взаимодействие их с переносчиком наиболее детально изучено на примере вируса полосатой мозаики пшеницы и тюльпанного клеща. Передаваемый клещом вирус вызывает изменение окраски у молодых листьев (пожелтение, штриховатость или полосчатость в виде светло-зеленых полос вдоль листа). При сильном поражении клещами листья скручиваются, образуя петли. Продуктивные стебли не развиваются, колосья содержат шуплые зерна. Растения сильно отстают в росте. Болезнь проявляется через 2–3 недели после появления всходов. Тритимовирусы поражают в основном злаковые культуры. Виды рода: вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП) *Wheat streak mosaic virus (WSMV)* – типовой вид; вирус полосатой мозаики костра (ВПМК) *Brome streak mosaic virus (BStMV)*; вирус полосатой мозаики сахарного тростника (ВПМСТ) *Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV)* – предполагаемый вид рода.

### Род *Potyvirus*

Самый многочисленный род не только среди родов семейства *Potyviridae*, но и всех родов вирусов растений других семейств. В VII Докладе МКТВ (Van Regenmortel et al., 2000) в этот род включено 167 видов. Вирионы рода *Potyvirus* – гибкие нити длиной 680–900 нм и шириной 11–13 нм.

**Свойства вирионов.** Капсид потивирусов состоит из мономеров белка весом 32–36 кДа (Hiebert, McDonald, 1973). Был проведен анализ аминокислотных последовательностей капсидных белков потивирусов. Оказалось, что типовой вид рода *Potyvirus* – Y-вируса картофеля содержит 267 аминокислот, а степень гомологии аминокислотных последовательностей разных потивирусов в среднем составляет 54 % (от 38 % до 71 %). При этом главные различия обнаруживаются в длине и последовательности их N-концов, в то время как C-терминальные части молекул сходны (Shukla, Ward, 1988).

Геном потивирусов представлен одноцепочечной, несегментированной молекулой (+)РНК, седиментирующей около 39 S, м.м. РНК составляет 3,0–3,5 мДа. Длина молекулы – около 10000 нуклеотидов. 5'-конец содержит ковалентно связанный белок, на 3'-конце располагается полиадениловая последовательность (Riechmann et al., 1992).

Установлено, что экспрессия генома потивирусов осуществляется через трансляцию вирусной РНК в полипротеин, затем происходит расщепление тремя вирусспецифическими протеиназами на несколько функциональных белков (Dougherty, Hiebert, 1980 а).

Анализ процесса трансляции РНК вируса гравировки табака и вируса крапчатости перца позволил составить генетическую карту потивирусов (Dougherty, Hiebert, 1980 б).

Согласно современным представлениям кодирующая емкость потивирусного генома составляет 8 белков. В молекуле РНК гены, кодирующие вирусные белки, сле-



дуют в следующем порядке: 5'-конец – белок Р1 – хелперный компонент – белок Р3 – белок цитоплазматических цилиндрических включений – белок 6К – белок ядерных включений Nia – белок ядерных включений Nib – капсидный белок – 3'-конец (Rojas et al., 1997).

Белок Р1, или добавочный фактор репликации вирусного генома, является ферментом протеиназой, которая участвует в расщеплении образующегося в результате трансляции РНК полипротеина на функциональные белки (Verchot, Carrington, 1995).

Белок 6К – мембранносвязанный белок весом 6 кДа, участвующий в репликации вируса в качестве фермента протеиназы (Restrepo-Hartwig, Carrington, 1994).

Белок Р3 обнаружен в зараженных клетках и имеет м.м. 42 кДа. Функции его неясны, однако предполагается, что он является трансмембранным интегральным белком (Rodriguez-Cerezo, Shaw, 1991).

Хелперный компонент потивирусов имеет м.м. 100–200 кДа (Govier et al., 1977) и является многофункциональным белком. N-концевая часть молекулы отвечает за передачу потивирусов тлями. На С-конце находится протеолитический домен, ответственный за освобождение его собственного С-конца из полипротеина, то есть он выполняет функцию протеиназы (Atreya et al., 1992; Atreya, Pirone, 1993). Поэтому данный белок в настоящее время называется «хелперный компонент – протеиназа» (НС-Pro). Вместе с тем имеются сообщения о точечных мутациях в С-концевой области, приводящих к снижению эффективности передачи тлями (Granier et al., 1993; Huet et al., 1994). Это свидетельствует о том, что векторной передачей потивирусов управляют несколько сайтов НС-Pro. Кроме того, данный фактор вовлечен в процесс репликации вируса и влияет на его накопление в клетке и экспрессию симптомов (Atreya et al., 1992), а также выполняет функцию транспортного белка (Kasschau et al., 1997).

*Вирусные включения.* В клетках зараженных растений потивирусы образуют включения. Они обычно располагаются в цитоплазме в виде цилиндрических или аморфных образований и состоят из мономеров вирусного неструктурного белка. М.м. белка цилиндрических включений составляет 67–70 кДа (Hiebert, McDonald, 1973). Исследование вируса шарки сливы показало, что данный белок обладает активностью РНК-хеликазы и АТФазы (Lain et al., 1991). Аморфные включения также состоят из неструктурного вирусного белка, но с м.м. 51 кДа (Mejia et al., 1985 a). Обнаружено, что ген, кодирующий данный белок, находится вблизи 5'-конца. Иммунохимические исследования показали связь данного продукта с фактором переноса (Mejia et al., 1985 b).

Ядерные включения образованы двумя неструктурными вирусспецифическими белками (Nia и Nib) с м.м. 49 и 54–56 кДа (Dougherty, Hiebert, 1980 a; 1980 b). Белок Nia (малый белок ядерных включений) выполняет функцию фермента протеиназы, участвуя в расщеплении полипротеина на отдельные белки. Он состоит из белка VPg и протеиназы. Большой белок ядерных включений (Nib) является РНК-зависимой РНК-полимеразой (Allison et al., 1986; Domier et al., 1987). В следующей главе более подробно остановимся на описании свойств дальневосточных изолятов вирусов рода *Potyvirus*.

**Антигенные свойства.** Вирусы – умеренные иммуногены, многие из них на поверхности капсидных белков имеют идентичные родо- и видоспецифичные эпитопы, что скорее всего связано с тем, что аминокислотная последовательность белка оболочки потивирусов гомологична на 40–70 %.

**Биологические свойства. Передача.** Вирусы рода *Potyvirus* экспериментально передаются механической инокуляцией сока. Передача и распространение потивирусов в природе осуществляется только тлями. Они переносятся непersistентно многими видами тлей: *M. persicae*, *M. ornatus*, *Aphis rhamni*, *A. craccivora*, *A. nasturcii*, *A. fabae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Acyrtosyphon pisum* и др. Однако некоторые изоляты потивирусов не передаются тлями, вероятно, из-за мутаций в цистроне хелпер-компонента или белка оболочки. Некоторые вирусы, чаще всего поражающие бобовые культуры, передаются семенами.

Вирусы рода *Potyvirus* вызывают серьезные потери урожая важнейших бобовых, овощных, декоративных, плодовых культур и картофеля. В качестве примера перечислим лишь некоторые наиболее изученные, широко распространенные и наносящие значительный урон растениеводству вирусы растений. Это вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ) *Bean yellow mosaic virus (BYMV)*; вирус обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ) *Bean common mosaic virus (BCMV)*; вирус мозаики свеклы (ВМС) *Beet mosaic virus (BMV)*; вирус слабой мозаики ириса (ВСМИ) *Iris mild mosaic virus (IMMV)*; вирус желтой карликовости лука (ВЖКЛ) *Onion yellow dwarf virus (OYDV)*; вирус крапчатости перца (ВКП) *Pepper mottle virus (PMV)*; А-вирус картофеля (АВК) *Potato virus A (PVA)*; Y-вирус картофеля (YВК) *Potato virus Y (PVY)*; вирус мозаики сои (ВМС) *Soybean mosaic virus (SMV)*; вирус мозаики турнепса (ВМТ) *Turnip mosaic virus (TMV)*; вирус крапчатости жилок гвоздики (ВКЖГ) *Carnation vein mottle virus (CVMV)*; вирус пестролепестности тюльпана (ВПТ) *Tulip breaking virus (TBV)*; вирус шарки (оспы) сливы (ВШС) *Plum pox virus (PPV)* и многие др.

В ДФО выявлено 12 вирусов рода *Potyvirus*: АВК, YВК, ВМС, ВОМФ, ВЖМФ, ВЖКЛ, ВМТ, вирус мозаики арбуза 1 (ВМА 1), вирус гравировки табака (ВГТ), а также идентифицированные как новые виды – вирусы традесканции белоцветковой (ВТБ) *Tradescantia albiflora virus (TAV)*; мозаики клевера гибридного (ВМКГ) *Trifolium hybridum mosaic virus (TMMV)*; мозаики гиппеаструма (ВМГ) *Hippeastrum mosaic virus (HMV)* (Крылов, 1992; Гнутова, 1993; Волков и др., 1994; Толкач, 1995; Гнутова, Толкач, 2002).

Изученные дальневосточные изоляты потивирусов имели вирионы нитевидной формы длиной 720–750 нм и шириной 11–15 нм.

Электрофоретический анализ выявил у белкового компонента вирусных частиц наличие нескольких пептидов. Гетерогенность структурного белка зависела от метода получения и времени хранения вирусных препаратов. М.м. нативного белка в была у YВК – 32–36, ВМС – 32–34, ВЖМФ – 28–32, ВМТ – 32–38, АВК и ВМКГ – 36, ВМГ – 30, ВЖКЛ – 35, ВОМФ – 32, ВТБ – 34 кДа. Отмечено, что в процессе очистки и хранения препаратов потивирусов происходит деградация вирусных частиц.

Геном вирусов представлен одноцепочечной молекулой (+)РНК с м.м. 3,0–3,5 мДа.



Исследуемые потивирусы были умеренными иммуногенами. С помощью различных методов иммунохимического анализа (конкурентного варианта ИФА, ракетного иммуноэлектрофореза и др.) удалось выявить идентичные эпитопы капсидных белков для всех изучаемых нами дальневосточных изолятов потивирусов.

Все вирусы легко передавались механически и отнесены к группе непersistентных вирусов. ВОМФ, ВЖМФ и ВМС передавались семенами, правда, в небольшом количестве – 3–6 %. Резерваторами потивирусов служили клубни, луковицы и семена.

Круг растений-хозяев, например, у ВМТ, УВК довольно широкий, а у вирусов, поражающих бобовые культуры (ВМС, ВЖМФ, ВОМФ и ВМКГ), он небольшой. Растения на инфицирование чаще всего реагировали развитием симптомов мозаики или крапчатости на листьях. У этих растений нередко деформировались плоды и семена, и в итоге значительно снижалось количество и качество продукции почти всех сельскохозяйственных растений, которые поражались этими вирусами.

### Вирус обыкновенной мозаики фасоли *Bean common mosaic virus*

Вирус обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ) широко распространен в мире, главным образом в районах возделывания бобовых культур.

**Биологические свойства.** Вирус впервые описан в 1917 г. в США (Stewart, Reddick, 1917). Он вызывал на растениях фасоли симптомы в виде системной светло-зеленой мозаики, скручивания листовой пластинки. Авторы наблюдали отставание больных растений в росте, отмечали уменьшение количества семян в стручках фасоли. В Европе вирус был выявлен много позже. Так, в Польше (Frensel, Pospeszny, 1980) его обнаружили на люпине *Lupinus luteus*. Круг поражаемых польским изолятом растений включал только виды семейства бобовых. Симптомы на люпине проявлялись в виде слабой мозаики листовой пластинки. Вирус заражал все используемые в эксперименте виды фасоли, вызывая на листьях слабую мозаику, только сорт Монгое реагировал образованием на листьях четких мелких некрозов. Системно на заражение вирусом реагировали и растения вигны радиальной *Vigna radiate*. Вирус передавался семенами люпина (16 %) и семенами зараженной фасоли (22 %). В Беларуси вирус обнаружен на люпине (Якушева, 1991), в Молдове – на промышленных посевах фасоли (Кайман, 1984), причем процент поражения растений достигал 70–100 %, в Украине – на фасоли (Московец, 1975; Билай и др., 1988), в Прибалтике – на фасоли (Станюлис, 1974). Вирус был обнаружен и в Казахстане на фасоли (Тулегенов и др., 1986). Итак, по литературным данным, ВОМФ поражает в основном растения семейства бобовых (роды *Phaseolus*, *Pisum*, *Trifolium*, *Vicia*, *Vigna* и др.). Симптомы на фасоли варьируются в зависимости от штамма вируса, сорта растения, внешних условий и времени заражения. В зависимости от симптомов проявления вирусной инфекции на растениях-хозяевах выявлено большое видовое разнообразие ВОМФ (изоляты и штаммы вируса) (Drufhout et al., 1978). В США, например, привалирует типичный

штамм ВОМФ, описанный еще в 1917 г. (Stewart, Reddick, 1917). Чаще всего симптомы имеют вид темно-зеленой мозаичной пятнистости вдоль крупных жилок на общем хлоротичном фоне листа. В центре листовой пластинки появляются темно-зеленые участки обычно пузыревидного вздутия, и лист становится морщинистым, от края скручиваясь вниз. Часто молодые верхушечные листья скручиваются трубочкой или деформируются асимметрично. Такие симптомы обычно наблюдаются на растениях, инфицированных через семена. Растения заметно отстают в росте, хуже цветут и плодоносят. На первично зараженных растениях фасоли вирус вызывает скручивание верхушечных листьев краями вниз, хлоротичность и слабую мозаику. При повышенной температуре летом симптомы часто маскируются (Билай и др., 1988).

Фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* и фасоль красная *Ph. coccineus* являются обычными естественными растениями-хозяевами вируса. Культивируемая фасоль различных сортов отличается по реакции на заражение вирусом. Различают несколько типов растений фасоли – толерантную, чувствительную или гиперчувствительную, но тип реакции зависит главным образом от штамма вируса (Grogan, 1948). На толерантных растениях фасоли инфекция проявлялась в виде легкого сужения системно инфицированных листьев; на чувствительных – на нижних листьях наблюдали красноватую морщинистость, скручивание или курчавость, а на верхних листьях – мозаику с темно-зелеными областями вдоль главной жилки, на стручках – крапчатость или уродливость стручков. Карликовость и пузырчатый некроз на зараженных растениях фасоли типичный штамм вызывал при 30 °С, а вирулентный – при 20 °С и выше. Пузырьковый некроз проникал в близлежащие ткани, например в стебли и стручки или в листья вокруг места внедрения инфекции. Гиперчувствительные сорта фасоли реагировали на ВОМФ появлением некротических локальных поражений при нормальной температуре и некротической пузырчатостью при высокой температуре окружающей среды. Фасоль обыкновенная обычно используется для размножения вируса в искусственных условиях с целью получения очищенного препарата ВОМФ, так как инфицированные в полевых условиях растения содержат вирус в невысокой концентрации.

Индикаторным растением для вируса служит фасоль американского сорта Торсторп, который относится по заражению ВОМФ к гиперчувствительным. На инокулированных примордиальных листьях появляются местные некрозы. Аналогичным образом на вирус реагируют сорта фасоли Пинто, Грейт Нозерн, Красный мексиканский (Red mexican). Для выявления вируса можно использовать не только сами растения этих сортов, но и их снятые листья, которые после инокуляции помещаются на фильтровальную бумагу во влажную камеру (чашки Петри) при искусственном освещении при температуре 30–32 °С. На 2–3 сут на них развивались некрозы. Но этот метод не всегда надежен, так как зависит от степени зрелости листа и внешних условий.

Вирус переносится механически и непersistентным способом многими видами тлей: *Acyrtosiphon pisum*, *M. persicae*, *Aphis fabae*, *A. rumisis* и др. (Bos, 1970; Morales, Bos, 1988). Кроме того, для этого вируса характерна семенная передача. При этом способе передачи вирус обнаружен в проростках семян, в семенной кожуре, в семядолях и зародышах сухих семян зараженных растений некоторых бобовых (Caroof et



al., 1986). У фасоли передача семенами может достигать до 50 %. Обнаружено также, что ВОМФ передается семенами вигны до 37 %. В семенной передаче вируса важную роль играет пыльца цветков зараженных растений. С помощью электронного микроскопа в экстрактах пыльцевых зерен растений фасоли обнаружены характерные для ВОМФ нитевидные частицы длиной 750 нм (Omar et al., 1978).

В клетках растений, зараженных ВОМФ, были обнаружены цитоплазматические включения двух типов: аморфные и кристаллические. Аморфные – гранулированные и вакуолизованные, кристаллические – кубические и гексогональные (Valdes et al., 1982).

ТТИ – 50–65 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 1–4 сут (Morales, Bos, 1988).

**Российский, китайский и корейский изоляты ВОМФ из фасоли.** В Приморском крае вирус впервые был выявлен на растениях клевера лугового (Рейфман и др., 1973). Дальневосточный изолят вируса заражал фасоль различных сортов, вызывая деформацию, пузырчатость и скручивание листьев. Отмечена семенная передача. На юге Приморского края в пригороде г. Владивостока были обнаружены растения фасоли с симптомами светло-зеленой мозаики и пузырчатости листьев (Толкач, Гнутова, 1998). По кругу растений-хозяев, по способам передачи насекомыми и семенами, морфологии вирусных частиц и другим классическим критериям идентификации патоген был отнесен к ВОМФ.

Для сравнительной характеристики свойств ВОМФ из фасоли использовали российский дальневосточный изолят и два азиатских – из Китая, любезно предоставленный коллегами из Северо-Восточной сельскохозяйственной академии (г. Харбин), и корейский, обнаруженный нами в 2005 г. в пригороде г. Пхеньян (КНДР) во время обследований посевов овощных культур согласно договору о научном сотрудничестве. Для изучения были отобраны растения фасоли обыкновенной с вирусоподобными симптомами (рис. 41). Ареал распространения ВОМФ обозначен нами в границах трех пограничных стран АТР, что предполагало сходство изолятов вируса по многим свойствам.

Изучен экспериментальный круг поражаемых растений исследуемыми изолятами ВОМФ (табл. 30). Инокулировали растения из семейств *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Изолятами вируса заражались только различные сорта фасоли, но исключение составил корейский изолят ВОМФ, который вызывал на *Ch. quinoa* локальные некрозы. Реакция различных сортов фасоли обыкновенной на заражение и интенсивность вызываемых изолятами симптомов варьировались. Итак, круг поражаемых растений как для российского дальневосточного, так и для азиатских изолятов ВОМФ схож и ограничивается культурными видами растений семейства бобовых.

**Морфология и вирусные включения.** В соке листьев пораженных растений фасоли с помощью электронного микроскопа обнаружены нитевидные частицы размером 720–770 нм. В световом микроскопе в эпидермисе наблюдали аморфные околядерные образования.

**Передача.** Вирус легко передавался персиковой тлей. Изучена возможность передачи вируса семенами. Так, для корейского изолята ВОМФ проверено 59 семян



Рис. 41. Растения *Phaseolus vulgaris*, пораженные корейским изолятом ВОМФ

фасоли. Симптомы вирусного поражения наблюдали у 42 растений, что соответствовало 73 %.

**Физические свойства вирионов.** Показано, что физические свойства вирионов российских дальневосточных и азиатских изолятов близки, но не идентичны. Российский изолят ВОМФ был стабильнее корейского и китайского (табл. 31).

**Физико-химические свойства.** В состав вирионов ВОМФ входит один полипептид с м.м. 32–35 кДа и однонитевая (+)РНК. Коэффициент седиментации  $S_{20,w}$  – 154–158 S, плавучая плотность в CsCl – 1,31–1,32 г/см<sup>3</sup> (Morales, Vos, 1988).

Исходным материалом для получения очищенных препаратов российского дальневосточного и китайского изолятов ВОМФ служили инфицированные вирусом растения фасоли сортов Черная спаржевая или Ю.Ту. Вирус выделяли по методу В.К. Новикова с соавт. (1982). Листья фасоли на 21–24-й день после инокуляции срезали и замачивали на 1,5 ч в 0,05 М калийно-фосфатном буфере с 0,25 %-ным 2-меркаптоэтанолом и с добавлением 0,05 М ЭДТА, pH 7,8, после чего листья го-



## Реакция тест-растений на заражение изолятами ВОМФ

Семейства, виды и сорта растений	Симптомы, вызываемые изолятами из фасоли:		
	Российский	Китайский	Корейский
<b>Brassicaceae</b>			
<i>Cheirantleus cheiri</i>	—*	—	0**
<b>Chenopodiaceae</b>			
<i>Chenopodium guinoa</i>	—	—	—
<i>Ch. giganteum</i>	—	—	—
<b>Cucurbitaceae</b>			
<i>Cucumis sativus</i> , сорта:			
Дальневосточный-6	—	—	—
Дальневосточный-27	—	—	—
<i>Cucurbita maxima</i> , сорта:			
Ананасная	—	—	—
Гантелевидная	—	—	—
<b>Amaranthaceae</b>			
<i>Melilotus alba</i>	—	—	—
<i>Medicago sativa</i>	—	—	—
<b>Fabaceae</b>			
<i>Cassa occidentalis</i>	—	—	—
<i>Faba bona</i>	—	—	—
<i>Phaseolus aureus</i>			
<i>Ph. vilgaris</i> , cvs:			
Pinto	S; GrM, Rull	S: M, Rull	—
Prince	S: CIM, Rull	S: GrM, Rull	—
Michelite	S: Rull	S: GrM	—
Top crop	L: N, Rull	S: ClVe, Rull	—
Perlicka	S: GrM, Rull	S: GrM, Rull	S: GrM, Rull
Red Kidney	S: GrM, Rull	S: M, Rull	S: ClVe, Rull
Saksa	—	—	—
Черная спаржевая	S: GrM, Rull	S: GrM, Rull	S: ClVe, Rull
Голубка	S: GrRM, Rull	S: GrM, Rull	S: GrRM, Rull
Изумрудная	—	—	S: ClVe, Rull
Белая	—	—	S: GrRM, Rull
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	—	—	0
<i>Vicia sativa</i> , сорт Луговской	—	—	0

\*Отсутствие симптомов заражения. \*\*Растения не заражались.

могенизировали. Затем pH вирусосодержащей жидкости доводили до 7,8, добавляли Тритон X-100 (1 % от объема жидкости). Вирус осаждали ПЭГ в присутствии 0,3 M NaCl в течение 2 ч при 4 °C. После чего проводили низкоскоростное центрифугирование, осадки экстрагировали 0,05 M боратым буфером, pH 7,8, в соотношении 1:2.

Физические свойства различных изолятов ВОМФ

Изоляты ВОМФ	Критерии физических свойств вирионов		
	ТТИ, °С	ПСИ, сут	ПРС
Российский (из фасоли)	62	1	10 <sup>-6</sup>
Китайский	55	5	10 <sup>-4</sup>
Российский (из клевера)*	55-60	2	—**
Корейский	50-55	2	10 <sup>-1</sup> -10 <sup>-2</sup>

\*По: Т.А. Поливанова, 1975. \*\*Данные отсутствуют.

Далее следовали два цикла дифференциального центрифугирования с применением 20 %-ной сахарозной подушки. Очищенный вирусный препарат обладал характерным спектром поглощения в УФ области. Выход вируса составил на 100 г зеленой массы для российского дальневосточного изолята ВОМФ 18-20 мг, китайского - 28-30 мг. Концентрацию вируса в препарате определяли, используя коэффициент экстинкции  $E_{260}^{0.1\%} = 2,4$ . Электронная микроскопия (марка Tesla BC-500) показала наличие в препаратах нитевидных частиц длиной 750 нм. Вирионы контрастировали 2 %-ным раствором вольфрамовой кислоты и просматривали при увеличении в 25-30 тыс.

По данным электрофореза было установлено, что в полученных препаратах ВОМФ присутствует один полипептид с м.м. 32 кДа, что свидетельствует о гомологии структуры капсидных белков исследуемых изолятов ВОМФ. У дальневосточного российского изолята ВОМФ м.м. нативных белков была 31,6 кДа, у китайского - 32,1 кДа, (рис. 42). Под действием органических растворителей, как видно из рисунка, происходило разрушение оболочки вирионов вируса, в результате капсидный белок расщеплялся на три полипептида. При хранении при 4 °С с добавлением азида натрия очищенные препараты изолятов ВОМФ сохраняли инфекционность в течение 8-9 мес.

**Антигенные свойства.** Выделены две группы ВОМФ, относящиеся к серотипам А и В (Edingto, Whitlock, 1988). Методом электрофореза в ПААГ установлены различия по м.м. капсидных белков типовых представителей этих групп. Изоляты серотипа А вызывали в клетках пораженных растений специфическую пролиферацию цитоплазматического ретикулума, которая никогда не возникает в клетках растений, пораженных изолятами серотипа В. Эти два серотипа различаются и по аминокислотным остаткам N-концевой области полипептидной цепи. Авторы высказали мнение об отнесении этих серотипов к разным вирусам. Однако МКТВ не убедили их доводы о разделении их на два вида, поэтому до сих пор ВОМФ разделяется некоторыми исследователями только на два серотипа.

Препарат российского дальневосточного изолята ВОМФ был использован в качестве антигена при получении поликлональной кроличьей антисыворотки. Применили следующую схему иммунизации: 1-й день - 0,4 мг вируса с адьювантом Фрейнда вводили п/к; 7-й день - 0,5 мг вируса с адьювантом Фрейнда п/к; 14-й день - 1 мг



антигена с адьювантом Фрейнда в/м. Через 1,5 мес реиммунизировали животных. Взятие крови проводили на 7, 9, 11-й день после последней иммунизации.

Титр антисыворотки по результатам непрямого варианта ИФА составил 1:12800. По литературным данным, имеются сведения об антигенном родстве ВОМФ с другими видами рода *Potyvirus*. Нами также были получены перекрестные реакции в непрямом варианте ИФА между изучаемыми изолятами ВОМФ и ВЖМФ (изолят из гладиолуса), УВК, ВМТ и ВМС. Анализируя порядок расположения кривых, констатировали о наличии антигенного родства между этими потивирусами. По антигенному родству самый высокий процент идентичных эпитопов показан у изучаемых изолятов ВОМФ с ВЖМФ.

Большой процент гомологии капсидных белков между российским дальневосточным и китайским изолятами ВОМФ установлен и электрофорезом. Методом ИФА выявили также наличие индивидуальных и общих эпитопов между этими изолятами и другими потивирусами. Отмечена более высокая антигенная активность российского дальневосточного изолята ВОМФ по сравнению с китайским изолятом. Однако была показана разница в накоплении вируса в тест-растении и конечном выходе вируса после очистки. Так, выход китайского изолята ВОМФ (28–30 мг/кг) был выше, чем у дальневосточного (18–20 мг/кг). Эти результаты говорят в пользу того, что близкая география распространения этих изолятов ВОМФ влияет на сходство не только фенотипических, но и генетически стабильных признаков.

Для изучения физико-химических и антигенных свойств корейского изолята ВОМФ его размножали и накапливали в растениях фасоли сортов *Saksa* и *Белая* в течение трех недель. Очищенный препарат получали по используемой выше методике для китайского и российского изолятов ВОМФ. Выход вируса составил 13 мг/100 г инфицированных листьев, что указывало на схожую способность накапливаться в растениях фасоли всех трех изучаемых изолятов ВОМФ. Корейский изолят ВОМФ обладал характерным для потивирусов спектром поглощения в УФ области. Чистота препарата ВОМФ  $A_{260/280} = 1,35$ .

Для корейского изолята ВОМФ также была получена активная поликлональная кроличья антисыворотка с титром в РДД 1:64–1:128. Схема иммунизации включала два введения вируса подкожно в дозе 1,5 мг с адьювантом Фрейнда и одно введение внутривенно (1,5 мг) с недельными интервалами. Отмечены перекрестные реакции в

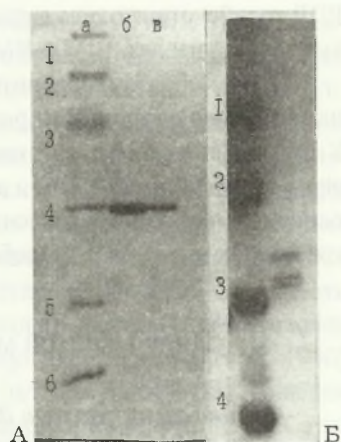


Рис. 42. Электрофореграмма капсидных белков ВОМФ (дальневосточный и китайский изоляты). А. а – белки-маркеры (1 – фосфорилаза, 94 кДа, 2 – БСА, 67 кДа, 3 – овальбумин, 43 кДа, 4 – карбоникангидраза, 30 кДа, 5 – трипсин-ингибитор, 20,1 кДа, 6 – лактоальбумин, 14,4 кДа); б, в – препараты ВОМФ (дальневосточный и китайский соответственно). Б. Деградация нативного белка у дальневосточного российского изолята ВОМФ под действием хлороформа: а – белки-маркеры (1–4), б – препарат ВОМФ

РДД корейского изолята с другими дальневосточными потивирусами (УВК, ВЖМФ – тыквенный изолят, ВГТ и ВМА 1), что свидетельствовало об их антигенном родстве.

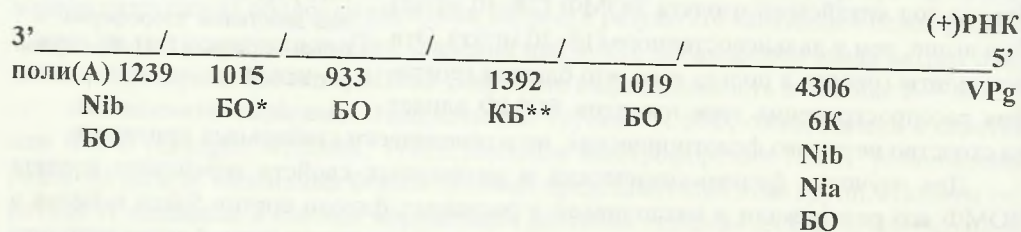
Таким образом, сравнительное изучение изолятов ВОМФ, идентифицированных на юге Дальневосточного региона России и в соседних странах (Северо-Восточный Китай и Северная Корея), показало их схожесть (но не идентичность) по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам и по распространенности вируса в основном на бобовых растениях. Ареал распространения ВОМФ в границах трех пограничных стран АТР способствовал сходству изолятов ВОМФ по многим свойствам.

### Вирус желтой мозаики фасоли *Bean yellow mosaic virus*

**Физико-химические и физические свойства.** Частицы нитевидной формы вируса желтой мозаики фасоли (ВЖМФ) имеют размер вириона  $700-750 \times 11-13$  нм, плавучая плотность в CsCl –  $1,318-1,325$  г/см<sup>3</sup>, структурный белок вируса с м.м. 33–35 кДа.

**Геном** вируса состоит из одноцепочечной (+)РНК, которая выполняет функцию матричной РНК и имеет простую линейную структуру. Размер генома 10000 п.н. При отщеплении на 3'-конце рибонуклеазой инфекционность РНК заметно снижается. Обычно поли(А) располагается после транскрибируемой области, но у ВЖМФ поли(А) расположена в начале. 5'-конец связан с белком VPg, м.м. которого около 24 кДа. Каждый участок генома представлен определенным количеством п.н. (1239, 1019, 1015, 993, 1392 и 4306), последовательность которых кодирует свой белок (см. схему).

Схематичное изображение генома ВЖМФ (10000 п.н.)



\*БО – белок оболочки. \*\*КБ – капсидный белок.

В участке генома на примере восточного австралийского изолята ВЖМФ с последовательностью 1239 п.н. показано, что 249 п.н. кодируют Nib, далее следует не кодирующий регион, равный 174 п.н., а после него – область с 849 п.н., кодирующая белок оболочки (Mathews et al., 1995). Авторы сравнивали изолят ВЖМФ с другими. В результате оказалось, что кодирующая последовательность тождественна на 85 % и на 92 % в аминокислотной и нуклеотидной последовательности, в не кодирующем регионе – на 99 % и на 97 % соответственно. Трейси с соавт. (Tracy et al., 1992), изучая



участок генома размером 1019 п.н. у атипичного штамма ВЖМФ (*ВУМV-S*) и сравнивая его с другими изолятами ВЖМФ, показали, что вирус мозаики гороха не является штаммом ВЖМФ. Это два самостоятельных вируса. Последовательность 1015 п.н. (Hammond J.H., Hammond R.V., 1989) включает в себя некодирующий участок размером 309 п.н. и кодирующий – 822 п.н. (изолят ВЖМФ из гладиолуса). Выявлен некодирующий регион (участок генома), кодирующий белок оболочки (сайт действия трипсина и сайт деления дипептида глутамин–серин), местонахождение которого авторы не указывают, и показано сходство как на нуклеотидном, так и на аминокислотном уровнях с другими изолятами ВЖМФ – на 50 % и на 60 % соответственно. Последовательность 993 п.н. (Boye et al., 1990) представлена только кодирующим участком генома (изолят ВЖМФ из гладиолуса). Последовательность 1392 п.н. изучена (Takahashi et al., 1990) на примере штамма хлоротичной пятнистости ВЖМФ (штамм *ВУМV-CS*). Участки генома 1–399 п.н. и 1219–1392 п.н. входят в состав некодирующего региона РНК этого штамма, а 400–1218 п.н. кодируют КБ. Последовательность 4306 п.н. у штамма ВЖМФ (*ВУМV-MB4*) включает некодирующий регион (1–295 и 4132–4306 п.н.) и кодирующий (296–4132 п.н.), причем последовательность 296–454 п.н. кодирует белок 6К, 455–1756 п.н. – белок Nia, 1757–3314 п.н. – белок Nib и 3315–4132 п.н. – белок оболочки (Nakamera et al., 1994).

Таким образом, особенности генома ВЖМФ заключаются в следующем: геном представлен 10000 п.н., поли(А) находится в середине транскрибируемой области; геном вируса имеет кодирующие и некодирующие участки, при этом на долю некодирующих приходится 10 %, кодирующих – 90 % от всего размера генома; отсутствуют перекрывающиеся рамки считывания.

**Белки.** В состав вирусной частицы входят неструктурные и структурные белки. Неструктурные белки: м.м. 56 и 51 кДа, Nia протеиназа и Nib полимеразы, белки оболочки (849, 853, 818, 822 п.н.) с м.м. 30,9 кДа, которые обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса на разных этапах. В состав вирусных частиц они не входят, а входят в состав ядерных включений.

В состав ВЖМФ входит 7 структурных белков, 5 из которых – белки оболочки, 1 – КБ (708 п.н.) и 1 – белок 6К (158 п.н.), 2 неструктурных с м.м. 56 кДа и 51 кДа, а также Nib полимеразы, Nia протеиназы. Нативный белок оболочки – 933 п.н. (29–38 кДа). Белки отличаются друг от друга по первичной структуре (составу аминокислот), размеру кодирующего их региона (число н.п.) и по м.м. Существует прямая зависимость между м.м. белка и размером кодирующего региона РНК (табл. 32).

**Биологические свойства.** *Круг растений-хозяев.* Вирус – полифаг и распространен по всему миру. Для него характерен весьма широкий круг растений-хозяев, входящих в более 10 семейств: *Amaranthaceae*,

Таблица 32

Структурные белки ВЖМФ

Название белка	Размер кодирующего участка РНК, п.н.
Белок оболочки	849
Белок оболочки	853
Белок оболочки	818
Белок оболочки	822 (30910 Д)
Нативный белок	933 (29–33 кДа)
Капсидный белок	708
Белок 6К	158

*Brassicaceae, Scrophulariaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Gentiana-ceae, Fabaceae, Iridiaceae, Papaveraceae, Solanaceae.* Перечислим лишь некоторые из видов растений-хозяев, которые поражает ВЖМФ: амарант (щирица хвостатая) *Amaranthus caudatus*; земляной или китайский орех *Arachis hypogea*; канна *Canna*; различные виды мари – белая *Ch. album*, амарантоцветная (красная) *Ch. amaranticolor*; квиноа *Ch. quinoa*; тыква гигантская *Cucurbita maxima*; соя культурная *Glycine max*; чечевица пищевая *Lens culinaris*; различные виды люпинов – люпин белый *Lupinus albus* L., люпин узколистный (синий) *L. angustifolius*, люпин желтый *L. luteus*; люцерна посевная *Medicago sativa*; различные виды табаков – клейкий *Nicotiana glutinosa* L., обыкновенный *N. tabacum*, махорка *N. rustica*; мак снотворный *Papaver somniferum*; некоторые сорта фасоли; физалис флориданский *Physalis floridana*; горох посевной *Pisum sativum*; шпинат огородный *Spinacia oleracea*; различные бобовые – некоторые виды клеверов, бобы конские, различные виды вигны. Из этого перечня следует, что вирус способен заражать главным образом бобовые и декоративные растения. Болгарский исследователь (Коваческий, 1972) в результате искусственного заражения выявил 135 видов растений, восприимчивых к ВЖМФ, из них 121 вид относился к семейству бобовых. Причем разные штаммы вируса могут существенно отличаться по кругу растений-хозяев (Тулегенов, 1989).

Растения, не восприимчивые к ВЖМФ: амарант *Amaranthus retroflexus*, свекла *Beta macrocarpa*, кассия тора *Cassia tora*, кабачок *Cucurbita pepo*, томат культурный *Lycopersicon esculentum*.

На фасоли симптомы имеют вид типичной мозаики из темно-зеленых пятен на хлоротичном фоне. Скручивание молодых листьев часто сопровождается характерным опусканием листа к черешку. Контрастная мозаика четко различима на листьях до конца вегетации. Растения отстают в росте, кустятся в связи с укорочением междоузлий, плодоношение снижается. Симптомы на листьях других растений (горох, бобы, донник, гладиолус), как правило, имеют характер четкой мозаики из темно-зеленых пятен. Тем не менее у некоторых видов ирисов вообще отсутствуют специфические симптомы заболевания (Alper, Loeberstein, 1981).

*Морфологические и гистологические изменения.* Вирус вызывает разнообразные гистологические и морфологические изменения в клетках инфицированных растений. К первым относятся: закупорка ксилемы полисахаридами, некротические отмирания и дезинтеграция перидермы, паренхимы, флоэмы, ксилемы, образование полостей в паренхиме, вакуолизация клеток паренхимы, флоэмы и волокон (Ortega, Zamora, 1990). К морфологическим изменениям относятся внешние признаки: деформация листьев и увядание побегов у белой фасоли (Ossure, 1980), задержка в росте, мозаики листьев, деформация бобов и измельчение семян у чечевицы (Russo et al., 1981), у фасоли – крапчатость и слабое подавление роста, некроз листьев, деформация стручков и, как следствие, преждевременная гибель растений (Tatchell et al., 1985), у клевера *Tr. versiculosum* – симптомы системной мозаики, морщинистость листьев, сильное подавление роста растений и увядание листьев (Bays, Demski, 1986), снижение качества цветов у гладиолусов (Stein et al., 1979) и т.д.



**Передача** вируса осуществляется в природе непersistентным способом, главным образом различными видами тлей, но основные среди них – *Aphis glycines* (эффективность передачи 67 %), *A. craccivora* (86 %) и *Myzus persicae* (87 %) (Ossure, 1980). Однако не все изоляты ВЖМФ могут передаваться тлями, например, *BYMV-S* не передается *A. craccivora* (Anon, 1990). Передача его возможна только при наличии в растении другого вируса – мозаики гороха. Вирус легко передается механически, возможна и передача семенами растений бобовых культур, например люпина – от 3 до 6 % (Билай и др., 1988) и бобов конских *Vicia faba* (Simay, Berzner, 1991).

**Вирусные включения.** В клетках инфицированных вирусом растений в электронном и световом микроскопе обнаруживаются пучки нитевидных вирусоподобных частиц, а также структуры типа мельчайших колесиков, характерные для потивирусов, и пластинчатые включения, типичные для ВЖМФ. Вирусные включения образованы из одного белка с м.м. 50–70 кДа (Тимошенко и др., 1989). Но по другим данным, различают большой и малый белки ядерных включений. Малый белок (Nia) с м.м. 49 кДа является полипротеином, состоящим из VPg и протеиназы, большой белок с м.м. 58 кДа (Nib) имеет аминокислотную основу РНК-зависимых полимераз. Аморфные цитоплазматические включения образованы белком с м.м. 52 кДа, названным НС-RPO, который обладает протеазной активностью хелпер-компонентов (цит. по: В.Г. Краев, 2001). Белки цитоплазматических включений не имеют антигенного родства с белками оболочки. Наличие вирусных включений в инфицированных клетках растений – надежный диагностический тест при идентификации ВЖМФ.

Имеются данные по влиянию на формирование вирусных включений минеральных элементов в почве. При недостатке магния (Mg) количество включений в клетках растений уменьшилось на 15 %, марганца (Mn) – на 20 %, железа (Fe) – на 30 %. При недостатке в почве микроэлементов встречаются ультраструктурные изменения в виде деформации хлоропластов, образование различных микротелец, изменение структуры митохондрий, что часто принимается за вирусные включения (Niegengerd, Nest-Bucholz, 1983).

**Антигенные свойства.** Уже на ранней стадии изучения родоспецифических эпитопов у отдельных потивирусов было показано антигенное родство ВЖМФ с вирусом мозаики гороха, передающимся семенами (Mognal, Franki, 1976), и вирусом пожелтения жилок клевера (Jones, Diachum, 1977). В дальнейшем нашими исследованиями было выявлено антигенное родство ВЖМФ с другими вирусами: мозаики гиппеаструма, мозаики турнепса, традесканции белоцветковой, мозаики сои, А и Y-вирусами картофеля (Гнутова, 1993).

**Видовое разнообразие.** ВЖМФ, как не один из вирусов, представлен большим видовым разнообразием. К 1984 г. было описано 2149 его штаммов и изолятов (Heriberts et al., 1984). Многие годы это огромное видовое разнообразие ВЖМФ пытались делить как по классическим критериям, так и по молекулярным параметрам на группы, паратипы, затем генотипы, но до сих пор нет единого мнения по их классификации.

На ДВ России первоначально вирус был идентифицирован на сое, затем на клевере (Поливанова, 1968; 1975), а позже – на гладиолусе гибридном *Gladiolus hybridum* Host. с симптомами штриховатой мозаики (Чуян и др., 1984). Остановимся на видовом



разнообразии ВЖМФ, поражающего декоративные, бобовые и овощные культуры, изоляты которого были идентифицированы за последние годы.

### Изоляты вируса желтой мозаики фасоли, поражающие декоративные культуры

В связи с развитием рыночных отношений в начале 90-х гг. прошлого столетия на Дальнем Востоке начинает интенсивно развиваться цветоводство как на промышленной основе, так и в частном секторе. К тому же с расширением международных отношений из ближнего и дальнего зарубежья в Дальневосточный регион стало завозиться много не только семян, но и посадочного материала декоративных растений, нередко пораженных вирусами. Хорошо известно, что зараженные маточные растения являются постоянными источником вирусной инфекции, распространение которой происходит как при вегетивном размножении, так и при наличии насекомых-переносчиков (тлей, клещей, жуков и т. д.). К тому же некоторые вирусы (например, X-вирус картофеля, ВТМ) могут передаваться от одного растения к другому контактно, не исключена и семенная передача.

В ДФО изучение вирусов, поражающих декоративные культуры, всегда было актуально. Фитосанитарный мониторинг, проведенный за последний период (2001–2008 гг.) в Приморском и Хабаровском краях, Камчатской и Сахалинской областях, показал, что большинство декоративных культур – многолетники, поэтому именно они являются основными резервуарами вирусов для других культурных растений. Замечено, что поражаются одними и теми же вирусами как декоративные, так и овощные культуры (а иногда картофель), произрастающие рядом. На рубеже XIX и XX веков было идентифицировано 15 вирусов: погремковости табака *Tobacco rattle tobnavirus*, X-вирус картофеля *Potato X potexvirus*, табачной мозаики *Tobacco mosaic tobamovirus*, кольцевой пятнистости гортензии *Hydrangea ringspot potyvirus*, традиции белоцветковой *Tradescantia albiflora potyvirus*, огуречной мозаики (ВОМ) *Cucumber mosaic cucumovirus*, аспермии томата *Tomato aspermy cucumovirus*, некроза табака *Tobacco necrosis necrovirus*, бессимптомности лилии *Lily symptomless carlavirus*, В-вирус хризантемы *Chrysanthemum B virus*, крапчатости гвоздики *Carnation mottle virus* и ВЖМФ (Крылов, 1992; Гнутова, Толкач, 2002). Эти вирусы негативно влияют на коммерческую ценность декоративных культур, снижая их качественные показатели. Наиболее опасным и распространенным среди выявленных, как показали наши исследования, был и пока остается ВОМ. Но в последние годы в ДФО на декоративных культурах наряду с этим вирусом часто стал встречаться ВЖМФ, который раньше был широко распространен на бобовых и реже на овощных культурах.

Изолят из гладиолуса гибридного (ВЖМФгл) был выявлен А.Х. Чуян с соавт. (1984), определен круг растений-хозяев. Три вида растений маи – *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. polyspermum* отвечали на заражение изолятом из гладиолуса образованием хлоротичных или некротических пятен на инокулированных листьях.



У мари квиноа *Ch. quinoa* поражение имело местный характер, в то время как у мари амарантоцветной *Ch. amaranticolor* вирус иногда проникал в верхние листья, хотя они внешне выглядели совершенно здоровыми, а мари многосемянная *Ch. polyspermum*, в отличие от них, всегда поражалась системно, при этом вокруг жилок верхних листьев ткань приобретала более светлую окраску (рис. 43).

У эмилии ярко-красной *Emilia sagittata* (Vahl.) DC заражались только листья, на которые наносился вирус. На них проявлялись четко очерченные кольцевые пятна бордовой окраски. Чина красная *Lathyrus cicera* L. заражалась системно, что выражалось в посветлении жилок верхушечных листьев.

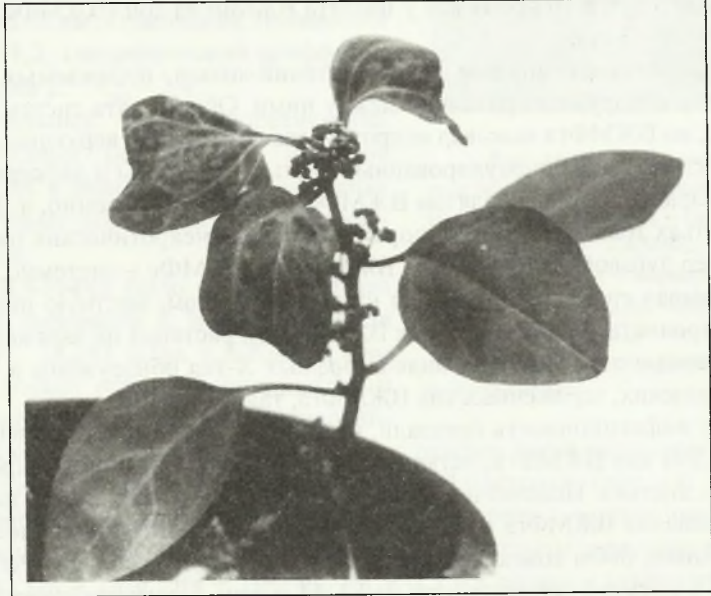


Рис. 43. Системное поражение в виде крапчатой мозаики верхних листьев мари многосемянной, инокулированной ВЖМФгл

Первоначальными признаками системного поражения у чины пурпурной *L. clutenum* L. также являлось посветление жилок листа. На более поздних стадиях развития заболевания на стеблях появлялись штриховатые некрозы. На 9-й день после инокуляции у люпина белого *Lupinus albus* L. на верхних листьях были видны некротические крапинки, а через неделю отмирала верхушечная часть стебля.

Инокулированные листья клевера пунцового *Trifolium incarnatum* L. реагировали на заражение некротическими кольцевыми пятнами. При дальнейшем течении болезни жилки приобретали более светлую окраску и на листьях появлялась полосчатая мозаика. Однако самую высокую чувствительность к вирусу проявляли растения бобов конских *Faba bona*. Через 10–12 дней после инокуляции на верхушечных листьях проявлялась крапчатость, которая сохранялась в течение всего вегетационного периода.

В природе резервуарами вируса являются многолетние бобовые растения, в частности клевера (Зитикайте, Станюлис, 1990).

В отличие от типичного штамма, который передается семенами бобов и фасоли (Bos, 1970), для ВЖМФгл семенной передачи мы не получили (Толкач, Гнутова, 1999).

По физическим свойствам ВЖМФгл незначительно отличался от типичного штамма по своим показателям: ТТИ – 56–60 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 24–32 ч, но если сравнивать эти данные с другими изолятами, например выделенным в Приморье из сои (Поливанова, 1968), то ВЖМФгл был более устойчив, имея ТТИ – 65–70 °С, чем изолят из сои – 56–60 °С, а изолят вируса из бобов конских сохранял инфекционность в течение 5 сут, в то время как у изолята ВЖМФ из сои (ВЖМФс) ПСИ в комнатных условиях – 3 сут.

При сравнительном анализе круга растений-хозяев, поражаемых ВЖМФгл и ВЖМФс, также обнаружены различия между ними. Оба изолята системно поражали люпин белый, но ВЖМФгл вызывал некротическое отмирание верхушки, а ВЖМФс – желтую крапчатость, а на инокулированных листьях – некрозы и деформацию.

Марь амарантоцветная изолятом ВЖМФс заражалась системно, а ВЖМФгл вызывал на ее листьях только локальные поражения в виде некротических пятен. Донник желтый, клевер луговой не заражались ВЖМФгл, а ВЖМФс – системно. Кроме того, ВЖМФгл вызывал системную реакцию на доннике белом, местную некротическую на фасоли остролистной, в то время как ВЖМФс эти растения не заражал.

Околяядерные образования в виде аморфных Х-тел обнаружены в клетках растений бобов конских, зараженных как ВЖМФгл, так и ВЖМФс.

Тесты на инфекционность показали, что марь квиноа является лучшим диагностическим видом для ВЖМФгл, четко реагирующим образованием некрозов на инокулированных листьях. Подсчет некрозов можно вести уже на 3-й день после заражения. Для накопления ВЖМФгл в растении в высокой концентрации более подходили, по нашим данным, бобы конские сорта Русские черные и фасоль св. Perlicka. Вирус накапливался в высокой концентрации на 12–14-й день с момента инокуляции и поддерживался на этом уровне довольно длительное время.

ВЖМФгл сравнительно легко передается механической инокуляцией сока и неперсистентно тлей *M. persicae*.

Для определения физико-химических свойств ВЖМФгл его накапливали и выделяли из бобов конских. Заражали здоровые растения механически в фазе 2–4 листьев. На 12–14-й день после инокуляции листья с характерными симптомами заболевания снимали. На одно выделение брали 250–300 г инфекционного материала. Все процедуры по очистке вируса выполняли в холодной комнате при 3 °С. Листья гомогенизировали без буфера с добавлением 0,15 %-ного диэтилдитиокарбамата натрия.

Вирусодержащую суспензию осветляли смесью хлороформа с четыреххлористым углеродом (7:1:1). Из освобожденной от клеточных компонентов жидкости вирус осаждали добавлением ПЭГ до 4–5 % с 0,3 М NaCl и далее концентрировали двумя циклами дифференциального центрифугирования (60000 g × 90 мин; 4000 g × 10 мин). Дальнейшую очистку вируса осуществляли в течение 2,5 ч центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (10–40 %) при 40000 g. Конечная проце-



дура – удаление низкомолекулярных веществ диализом против 0,001 М боратного буфера, рН 7,3–7,4, в течение ночи с последующим центрифугированием вирусной суспензии при  $3000 \text{ g} \times 10 \text{ мин}$ .

Этот метод позволил получить 30–40 мг вируса на 1 кг растительного материала. Препараты имели типичный спектр поглощения нуклеопротеида в УФ области с минимальной абсорбцией при 240 нм и максимальной при 260 нм. Отношение экстинкций  $A_{260/280} = 1,1\text{--}1,2$ , специфический коэффициент поглощения  $E_{260}^{0,1\%} = 2,4$ .

Сравнительный электрофоретический анализ капсидных белков трех изолятов ВЖМФ в ПААГ в денатурирующих условиях выявил некоторые различия в структуре капсидных белков.

Так, у ВЖМФгл было обнаружено два полипептида (основной с м.м. 32,173 кДа и минорный – 28,283 кДа), у ВЖМФф (фасолевый) – только основной полипептид и продукты протеолиза, а у ВЖМФу (украинский) – два основных белковых компонента с равным распределением м.м., причем для первого полипептида отмечен незначительный протеолиз (рис. 44).

Очищенные препараты ВЖМФгл обладали достаточно выраженной иммуногенной активностью. Антисыворотки получали по двум схемам иммунизации:

**1 схема:** 1-й и 14-й дни – 1 мг вируса + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда + 0,25 мл АКДС в/к и около 25 мкл иммуногена п/к вводили кролику в большое число точек вдоль позвоночника. 7-й и 21-й дни – 1 мг вируса в/в в краевую ушную вену.

**2 схема:** 1-й день – 1 мг вируса + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда в/к. 7-й – 1 мг вируса + 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда в/м в задние лапки. 21-й день – 1 мг вируса в/в. Взятие крови проводили на 7, 9, 11 и 18-й дни после последней инъекции.

Титры специфических антител в КА были довольно высокими – 1:512–1:4096. Такие же титры были получены и другими исследователями – 1:128–1:1024 (Горбунова и др., 1971), но известны данные, когда антисыворотки получали с более высокими титрами антител в КА – 1:32768–1:1048676, в РДД – 1:64–1:128 (Provvidenti, Schroeder, 1973).

Нами были проведены исследования по динамике нарастания титра специфических противовирусных антител в крови иммунизированного кролика в зависимости от дозы, способа введения иммуногена, использования адьювантов и сроков проведения иммунизации, а также реиммунизации (рис. 45).

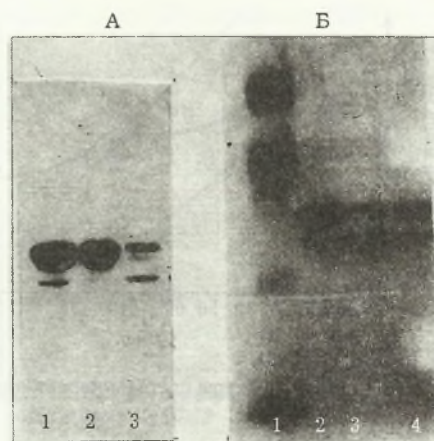


Рис. 44. Электрофореграмма капсидных белков дальневосточных и украинского изолятов ВЖМФ. А – свежевыделенные препараты: 1 – ВЖМФгл, 2 – ВЖМФф, 3 – ВЖМФу; Б: 1 – маркеры с м.м. (сверху вниз): БСА (66 кДа), альбумин (45 кДа), трипсиноген (24 кДа), лизоцим (14 кДа); 2, 3, 4 – вирусные препараты после 2-месячного хранения

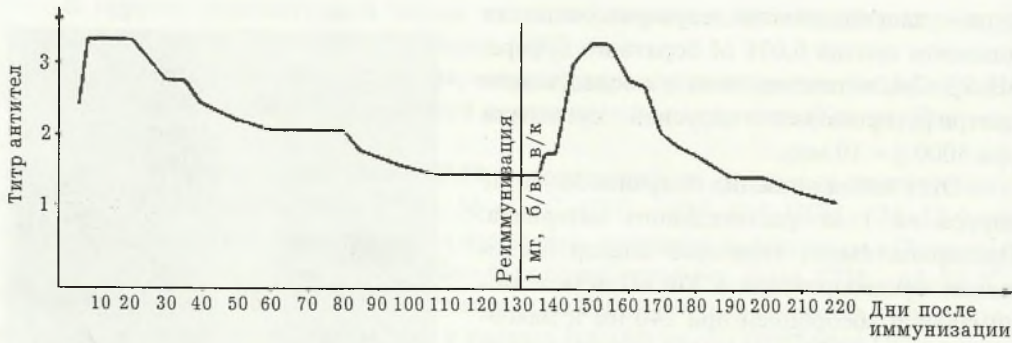


Рис. 45. Титры специфических антител во время иммунизации и реиммунизации

Вирус, имея относительно длинные частицы, порядка 720–750 нм (рис. 46), практически не диффундировал сквозь поры агарового геля. Для разрушения вирионов проводили их обработку физическими или химическими способами. Воздействие на вирионы ультразвука 15–18 кГц при 4 °С в течение 5–10 мин или прибавление к антигену 0,1 %-ного ДСН или 0,1 %-ного твин-20 приводило к разрушению вирусных частиц на более мелкие фрагменты, которые были способны проникать через поры агара в РДД и РИД и взаимодействовать со специфическими Ат. Внесение в 1 %-ный агаровый гель 1,5 %-ного ПЭГ способствовало более четкому проявлению полос преципитации в РДД. В то же время добавление к соку растений бобов конских 0,01 %-ного 2-меркаптоэтанола препятствовало образованию темных ореолов вокруг лунок с соком. При использовании в качестве антигена свежего сока из бобовых растений в РДД и РИД четкие полосы преципитации наблюдали и при предварительном осветлении сока смесью хлороформа и четыреххлористого углерода. Сравнительная оценка специфичности и чувствительности иммунохимических методов (РДД, РИД, РИЭФ и ИЭМ) для диагностики ВЖМФгл показала их надежность.

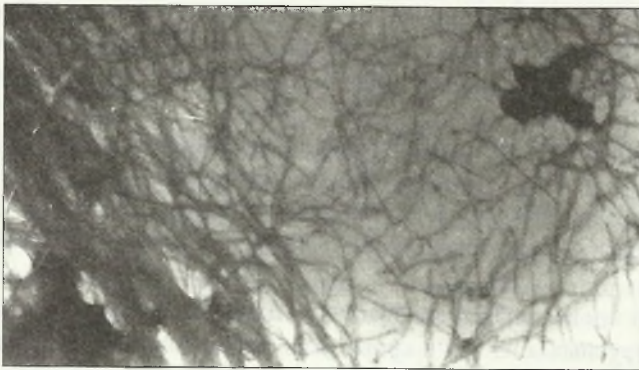
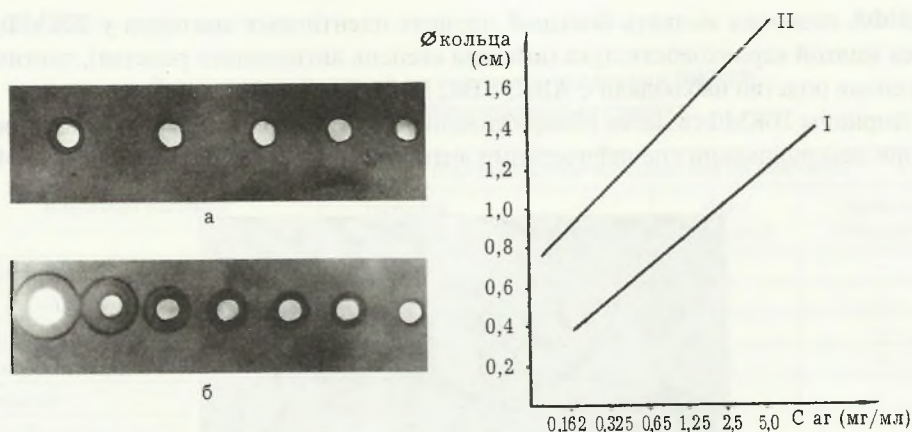


Рис. 46. Электронная микрофотография ВЖМФ (изолят из гладиолуса) ( $\times 90000$ )

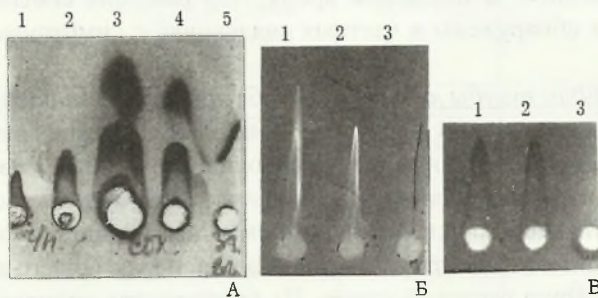




**Рис. 47.** Определение концентрации ВЖМФ в соке инфицированного растения методом радиальной иммунодиффузии. Концентрация Ас в геле – 4 %, в лунках – препарат вируса (2,5 мг/мл) в разведении (а); разведение инфекционного сока – 1:2, 1:4..., 1:128 (б); калибровочные кривые титрования вирусного препарата (I) и испытуемого сока бобов конских (II)

С помощью этих методов удалось определить количество вируса как в соке, так и в препарате. Методы отличались наглядностью, например, при постановке РИЭФ (рис. 47). Концентрация специфической антисыворотки в геле была 0,5 %. В предварительных опытах, в которых использовали очищенный препарат вируса с известной концентрацией, было установлено, что диаметр кольца вокруг лунки в 7 мм соответствовал 1 мг вируса в соке. На рис. 47 концентрация вируса в соке, который был взят в качестве антигена, – 1,6 мг/мл.

При детекции вируса РИЭФ и ИЭМ показывали более высокую чувствительность, чем РДД и РИД (рис. 48).



**Рис. 48.** Иммунодиагностика ВЖМФ ракетным иммуноэлектрофорезом. А – разведение Ас 1:40, Б – 1:400, В – 1:800; А, Б, В: 1, 2 – концентрация вируса в лунках 1 мг/мл; А: 3, 4 – сок растения бобов конских, инфицированного ВЖМФгл, 5 – контроль (сок здорового растения); Б, В: 3 – контроль

ИФА позволил выявить большой процент идентичных эпитопов у ВЖМФгл и вируса желтой карликовости лука (высокая степень антигенного родства), частичное антигенное родство наблюдали с АВК, УВК, ВМТ, ВМГ и ВТБ.

Вирионы ВЖМФгл легко обнаруживались ИЭМ в виде специфических скоплений при декорировании специфическими антителами (разведение Ас 1:50) (рис. 49).

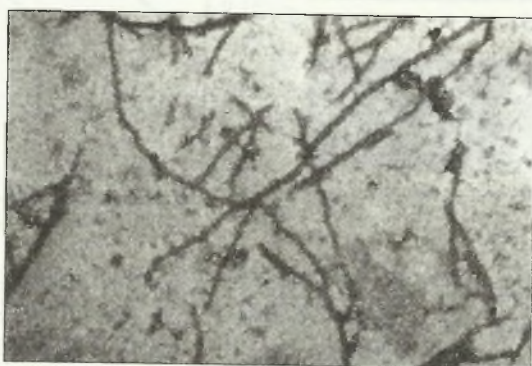


Рис. 46. Вирионы ВЖМФ, декорированные антителами

Таким образом, ВЖМФгл по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам проявлял достаточно высокую иммуногенную и антигенную активность. Титры специфических антител в классических иммунохимических реакциях были достаточно высокими. Как антиген вирус легко формировал иммунный комплекс не только со специфическими антителами, но и антителами против других потивирусов (правда, в разной степени), что свидетельствовало о принадлежности ВЖМФгл к роду *Potyvirus*. Методы РДД, РИЭФ, ИЭМ и ИФА отличались наглядностью и надежностью.

Ниже приводим результаты идентификации ВЖМФ из нескольких декоративных растений (ириса гибридного, гладиолуса гибридного, аукубы японской и тигридии павлиньей), полученные за последнее время. Эти растения семейств Кизиловые и Касатиковые были обнаружены в частных коллекциях с симптомами вирусного поражения.

Изолят ВЖМФ из аукубы японской. Аукуба японская *Aucuba japonica* Thunb. относится к семейству кизиловых *Cornaceae* Dum. Благодаря своей внешней привлекательности аукуба японская приобрела широкую популярность как цветочная культура для оформления интерьеров зданий. Выявлено растение аукубы японской с симптомами стягивания главной жилки и сильного скручивания листьев в личной коллекции цветовода-любителя. Идентификацию патогена, поражающего аукубу японскую, начали с изучения круга растений-хозяев. Их генетическая природа часто оказывает влияние на результат заражения растений определенным вирусом. Изолятом вируса аукубы японской инокулировали растения 21 вида и сорта из семейств *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, но заражались растения главным образом из семейства *Fabaceae* (табл. 33).



Реакция тест-растений на заражение изолятами ВЖМФ, выявленными на декоративных растениях

Вид и сорт растений	Вирусный изолят и вызываемые им симптомы			
	Тигридия павлинья	Аукуба японская	Ирис гибридный	Гладиолус гибридный
<i>Amaranthus caudatus</i>	0*	—**	—	—
<i>Am. hybridus</i>	0	—	—	—
<i>Capsicum annuum</i>	0	0	—	—
<i>Chenopodium quinoa</i>	L: N	0	0	0
<i>Ch. murale</i>	L: N	0	—	—
<i>Cucumis sativus</i> , сорта: ДВ-6	0	0	0	—
Восток	0	—	—	0
Родничок	0	—	0	—
Уссурийский-3	0	—	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> сорта: Зебра	0	0	0	0
Грибовский	0	—	0	—
<i>C. maxima</i> , сорт Ананасная	0	0	0	0
<i>Celosia argentea</i>	S: CIMot, Dis	—	—	—
<i>C. cristata</i>	0	—	—	0
<i>Dahlia pinnata</i>	0	—	0	0
<i>Datura stramonium</i>	0	0	0	0
<i>Dolichos lablab</i>	—	S: Dis	0	0
<i>Faba bona</i>	S: GrBdVe	S: CIM	S: GrSp	S: GrM, Cl
<i>Gaillardia hybrida</i>	0	—	—	—
<i>Gomphrena globosa</i>	—	0	0	0
<i>Hyoscyamus niger</i>	0	—	—	—
<i>Pisum sativum</i> , сорта: Амброзия	S: CIMot	—	—	—
Конек-Горбунок	S: CIMot	S: ClSp, Str	S: CIMot	—
Сахарный малыш	S: CIMot	—	—	S: ClVe
Фуга	S: CIMot	—	—	—
Чудо Кельвидона	S: CIMot	—	—	—
<i>Medicago sativa</i>	—	0	S: ClBdVe	—
<i>Melilotus officinalis</i>	0	—	S: ClVe	S: ClBdVe
<i>M. alba</i>	—	0	S: Dis, ClVe	0
<i>Phaseolus vulgaris</i> , сорта: Saksa	0	—	—	—
Perlicka	S: GrMot	—	S: CIMot	S: O
Московская белая	S: GrMot	0	0	0
<i>Ph. angularis</i>	0	—	0	—
<i>Ph. ricardianus</i>	0	—	—	0
<i>Ph. franschetii</i>	S: CIMot, Dis	—	—	—
<i>Petunia hybrida</i>	S: ClVe, Mot	0	0	0
<i>Nicotiana glauca</i> , сорт Зеленый свет	0	0	—	0

Вид и сорт растений	Вирусный изолят и вызываемые им симптомы			
	Тигридия павлинья	Аукуба японская	Ирис гибридный	Гладиолус гибридный
<i>N. tabacum</i> , cvs.: Samsun	0	0	0	0
Xanthi	0	0	0	0
<i>Nicandra physaloides</i>	0	0	—	—
<i>Tagetes</i> sp.	—	0	0	
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	S: CIMot, Dis	S: ClStr	S: ClVe, Stu	S: ClBdVe
<i>Tetragonia expansa</i>	0	—	—	—
<i>Vigna sinensis</i> , cv. Black eye	S: CIM, Dis	0	0	0
<i>Zinnia elegans</i> , cv. Peppermint stick	0	—	0	0

0 — отсутствие симптомов заражения, прочерк — растения не заражали.

Самым чувствительным тест-растением из диагностических видов на заражение этим изолятом были бобы конские. На 7–8-й день на них проявлялась системная реакция в виде хлоротичной мозаики листовой пластинки (рис. 50).

Горох посевной *P. sativum* сорта Конек-Горбунок на 10-й день реагировал на заражение деформацией листовой пластинки, хлоротичной пятнистостью и штрихова-

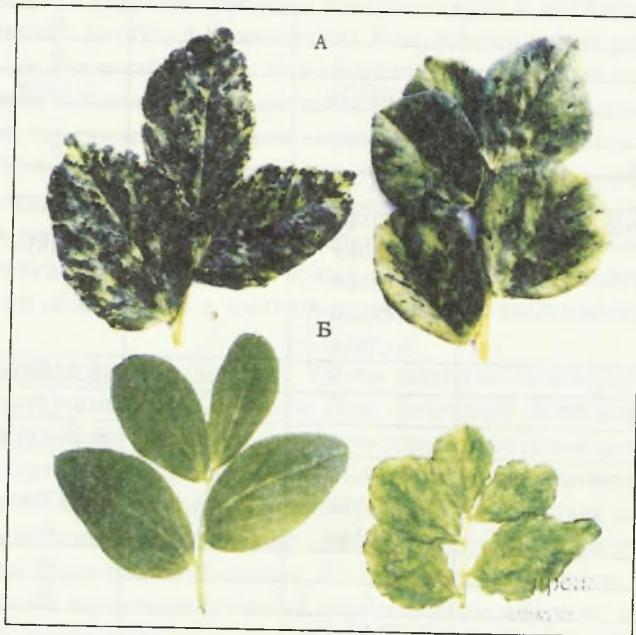


Рис. 50. Симптомы, вызванные изолятом ВЖМФ из аукубы японской: хлоротичная мозаика на листьях *Faba bona* (А) и *Trigonella foenum-graecum* (Б)



тостью. На пажитнике сенном *Trigonella foenum-graecum* L. на 5-й день после инокуляции наблюдали яркую хлоротичную штриховатость (рис. 50Б), а у лобии *Dolichos lablab* – деформацию молодых листьев.

Физические свойства вирионов изолята из аукубы японской были получены следующие: ТТИ – 70–75 °С, ПСИ – 2 сут, ПРС – 10<sup>-4</sup>.

В световом микроскопе в клетках растений *F. bona*, пораженных вирусом, были выявлены околядерные X-тела, типичные для вирусов рода *Potyvirus*. В электронном микроскопе в соке инфицированных растений *F. bona* обнаружены нитевидные частицы размером 886 нм.

Вирус легко передавался на другие растения тлями *M. persicae*.

С помощью РДД получены данные об антигенном родстве изучаемого изолята с УВК, вирусом гравировки табака и тыквенным изолятом ВЖМФ (рис. 51).

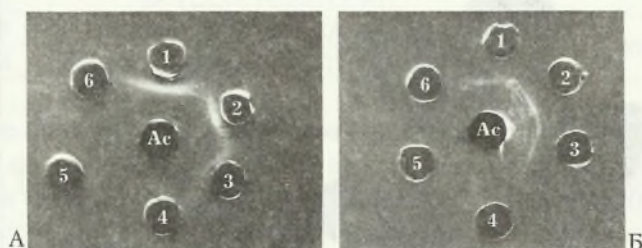


Рис. 51. Реакция Ас к изоляту ВЖМФ (тыквенный изолят) с изолятами из аукубы японской (А) и тигридии павлиньей (Б). В центральных лунках – Ас к ВЖМФ, в периферических – Аг: 1, 2, 3 – изолят из аукубы японской, 4, 5, 6 – сок здорового растения (А); Аг: 1, 2, 3 – изолят из тигридии павлиньей, 4, 5, 6 – сок здорового растения (Б)

Таким образом, на основании данных, полученных при изучении свойств изолята ВЖМФ, выявленного на аукубе японской, он по биологическим и антигенным свойствам отнесен к изоляту вируса с индивидуальными отличиями от обычного штамма ВЖМФ.

**Изолят ВЖМФ из тигридии павлиньей.** Тигридия павлинья *Tigridia pavonia* (L.f.) Ker Gawl. относится к семейству Касатиковые *Iridaceae* Juss. Как декоративное растение последнее время привлекает внимание цветоводов широким спектром окраски цветов. Растение с симптомами хлоротичной штриховатости было обнаружено в коллекционных насаждениях декоративных культур открытого грунта. Для идентификации возбудителя, поражающего тигридию павлинью, инокулировали 40 видов и сортов растений из семейств *Amaranthaceae*, *Aizoaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*. Симптомы системного поражения проявлялись на 13 видах и сортах растений (табл. 33), и только два вида марей – квиноа *Ch. quinoa* и стенная *Ch. murale* реагировали на заражение образованием локальных некрозов. Целозия серебристая *Celosia argentea* и физалис земляничный *Physalis franchetii* отвечали на заражение хлоротичной крапчатостью и

деформацией листьев. Растения *P. sativum* сортов Чудо Кальвидона, Конек-Горбунок, Фуга, Амброзия, Сахарный малыш, использованные в эксперименте, реагировали на инфицирование хлоротичной крапчатостью. У фасоли обыкновенной *Ph. vulgaris* вирусом заразились сорта Московская белая и Perlicka, а Saksa оказалась устойчивой к вирусу. Петуния гибридная *Petunia hybrida* реагировала на заражение хлорозом жилок и светло-зеленой крапчатостью, пажитник сенной *Tr. foenum-graecum* и вигна китайская *Vigna sinensis* cv. Black eye – хлоротичной мозаикой, крапчатостью и деформацией листьев.

Наилучшим тест-растением для размножения и накопления изучаемого изолята вируса являлись растения *F. bona* (рис. 52).



Рис. 52. Справа – листья растения *Faba bona*, зараженного ВЖМФ (изолят из тигридии павлиньей), слева – листья здорового растения

В световом микроскопе в эпидермальных клетках листьев *F. bona*, зараженных изучаемым изолятом ВЖМФ, выявлены вирусные включения в виде X-тел, характерные для видов рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*.

Вирус, обнаруженный на тигридии павлиньей, передавался тлей *M. persicae*.

Семенами зараженных вирусом растений *Ph. franchetii* и *P. sativum* вирус не передавался (проверено 60 и 30 семян соответственно). Однако на всех сеянцах, полученных из семян инфицированных растений *Ph. vulgaris*, наблюдали симптомы вирусного поражения (проверено 25 семян).

В электронном микроскопе в препаратах, приготовленных из сока инфицированных изолятом ВЖМФ растений *F. bona*, обнаружены нитевидные частицы, длина которых составляла 750 нм.

Изучены физические свойства вируса: ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 1 сут.

В РДД отмечена специфическая реакция изучаемого изолята с антителами против изолята ВЖМФ из тыквы (рис. 51), а также с УВК и ВГТ, но самая высокая степень антигенного родства показана с изолятом ВЖМФ из тыквы.



Для подтверждения надежности выше перечисленных критериев идентификации был применен Ю.В. Богуновым чувствительный метод диагностики изолята вируса из тигридии – ОТ-ПЦР, основанный на получении суммарной растительной РНК кислотнотенольным методом, получении кДНК и амплификации двух фрагментов вирусного генома со специфическими праймерами (табл. 34).

Таблица 34

Праймеры, использованные для амплификации изолята ВЖМФ из тигридии павлиньей

Праймер	Последовательность (5'-3')	Размер ампликона, п.н.
BE-1F	AGCTGAGTTGGAAAGATAC	516
BE-1R	GCTCCTCTCCATCCATC	
BE-2F	TCAGGAGATTTACAAGGTG	506
BE-2R	AAATGCTGGAGGTGAAAC	

В качестве мишени отжига праймеров выбран ген, кодирующий белок капсидной оболочки, так как он является наименее изменчивым в геноме потивирусов (Adams et al., 2005). На электрофореграмме показаны результаты анализа (рис. 53). Только с изолятом из тигридии павлиньей ВЖМФ наблюдали амплификацию двух фрагментов расчетной длины, что свидетельствовало о присутствии в нем РНК вируса.

Фрагменты ДНК, получаемые с помощью праймеров (BE-1F, BE-1R, BE-2F, BE-2R), в сумме представляли полноразмерную копию гена белка оболочки ВЖМФ, что позволяет использовать их для идентификации, изучения генетических характеристик изолятов ВЖМФ и установления филогенетических взаимоотношений.

Результаты по изучению восприимчивого к изоляту вируса из растений тигридии павлиньей круга растений-хозяев, физических свойств вирионов, передачи вируса механически, тлями и семенами, морфологии и размеров вирусных частиц, типу внутриклеточных вирусных включений, а также данные ОТ-ПЦР и высокая степень идентичности эпитопов капсидных белков с тыквенным изолятом ВЖМФ дают возможность отнести изучаемый изолят к обычному штамму вируса желтой мозаики фасоли.

*Изолят из ириса гибридного.* Касатик садовый *Iris hybrida hort.* из семейства касатиковых относится к группе ведущих декоративных многолетников и часто используется для срезки, выгонки, а также бордюрных и групповых посадок на альпийских горках, некоторые виды – для оформления водоемов. Кроме основного использования в цветоводстве, ирисы находят свое применение в медицине и парфюмерии, пищевой, витаминной,

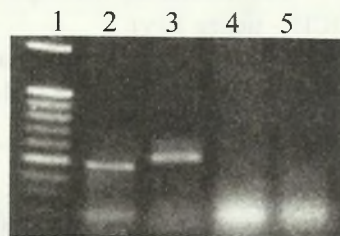


Рис. 53. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами на присутствие в изучаемых образцах РНК ВЖМФ (фото Ю.В. Богунова). 1 – ДНК-маркер с м.м. 100 bp + Ladder 1,5 Kb, треки: 2 и 4 – амплификация с праймерами BE-1F-BE-1R, 3 и 5 – с праймерами BE-2F-BE-2R

текстильной и других отраслях промышленности. Ирис с симптомами хлоротичной пятнистости и штриховатости был выявлен в частных посадках декоративных культур на юге Приморья.

Методом электронной микроскопии в препаратах, приготовленных из зараженных растений ириса, выявлены нитевидные частицы, размер которых составлял 720–750 нм.

Для идентификации вируса, обнаруженного на ирисе гибридном (ВЖМФи), изучали экспериментальный круг растений-хозяев. Вирусом инокулировали растения 25 видов и сортов из семейств *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae* (табл. 33). При этом заразились только 7 из семейства *Fabaceae*. Донники белый *Melilotus alba* и лекарственный *M. officinalis* реагировали на заражение хлорозом жилок листа, кроме того, на доннике белом наблюдали деформацию молодых листьев. На растениях *Ph. vulgaris* cv. Perlicka, *P. sativum* сорта Конек-Горбунок вирус вызывал хлоротичную крапчатость, у *F. bona* – зеленую пятнистость листьев (рис. 54), на *Tr. foenum-graecum* – хлороз жилок листа и задержку роста растений. Остальные экспериментально зараженные виды и сорта тест-растений оставались устойчивыми к ВЖМФи.

Не выявлена семенная передача изолята вируса из ириса гибридного ни на тест-растениях, ни методом электронной микроскопии у люцерны посевной *Medicago sativa* (проверено 40 семян) и у *P. sativum* (26 семян), вирус не обнаружили и у сеянцев этих растений.

Проверена передача ВЖМФи тлями *M. persicae*. На 5–7-й день после заражения на чувствительных к вирусу тест-растениях появлялась системная реакция в виде хлоротичной крапчатости листьев.

В эпидермисе пораженного листа *F. bona* обнаружены околядерные Х-тела, характерные для потивирусов.

Результаты изучения физических свойств вируса: ТТИ – 55–60 °С, ПРС –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ , ПСИ – менее 1 сут.

Отмечена положительная реакция в РДД изучаемого изолята с антисыворотками к потивирусам (УВК, ВМА, ВЖМФ и др.), что свидетельствовало об антигенном родстве эпитопов капсидных белков этих вирусов.



Рис. 54. Слева – листья растения *Faba bona*, зараженного ВЖМФ (изолят из ириса гибридного), справа – листья здорового растения

Результаты исследований по выявлению экспериментального круга растений-хозяев, изучению симптомов, физических и антигенных свойств, данные световой и электронной микроскопии, в также анализ литературных данных позволили сделать вывод о том, что ирис гибридный поражался ВЖМФ.

Изолят ВЖМФ из гладиолуса гибридного. Другое название этого растения –



шпажник *Gladiolus x hybridus hort.*, он относится к семейству Касатиковые. Гладиолус очень популярен и выращивается в различных окрасках, от белой до темно-красной и фиолетовой. Как правило, цветы используются для срезки. Мелкоцветковые сорта могут применяться для оформления парадных участков. Гладиолус с симптомами яркой хлоротичной полосчатости был обнаружен при визуальном осмотре коллекционных посадок гладиолусов у частного предпринимателя.

Электронно-микроскопическое исследование препарата, приготовленного из пораженного растения гладиолуса гибридного, показало наличие нитевидных частиц длиной, характерной для вирусов рода потивирусов. Кроме того, изучаемый изолят четко реагировал в РДД с антисыворотками к вирусам из рода потивирусов (ВГТ, ВМА, тыквенный изолят ВЖМФ).

Экспериментальный круг растений-хозяев включал растения 23 видов и сортов из семейств *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Заразилось исследуемым вирусным изолятом (ВЖМФгл/г) только 5 растений из семейства *Fabaceae* (табл. 33), а наиболее чувствительным диагностическим видом, реагирующим на заражение зеленой мозаикой и ярким хлорозом листа, являлись бобы конские (рис. 55).

На листьях *M. officinalis* и *Tr. foenum-graecum* развивалось хлоротичное окаймление жилок, на молодых листьях *P. sativum* сорта Сахарный малыш – яркий хлороз жилок листьев, а растения фасоли *Ph. vulgaris* cv. Perlicka реагировали на ВЖМФгл/г бессимптомно.

Физические свойства изучаемого изолята: ТТИ – 50–55 °С, ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , ПСИ – менее 1 сут. Они явно отличались от показателей ВЖМФгл, идентифицированного нами ранее. Последний был более устойчив, имея ТТИ – 65–70°С и ПСИ – 5 сут.

Проведена работа по проверке семенной передачи ВЖМФгл/г у пораженного растения гороха. Методом электронной микроскопии вирус в сеянцах обнаружен не был, что свидетельствовало об отсутствии семенной передачи. Но вирус легко передавался механически и тлями *M. persicae* с больных *F. bona* на здоровые растения бобов конских.

Световой микроскопией в эпидермисе листьев *F. bona*, инфицированных ВЖМФгл, обнаружены околядерные образования – Х-тела, характерные для потивирусов.

Проведенный нами анализ литературных данных и полученных результатов по изучению морфологии вирусных частиц, положительной реакции с антисыворотками против некоторых вирусов из рода потивирусов, по кругу растений-хозяев, симптоматологии и физическим свойствам вирионов свидетельствовал о том, что заболевание на гладиолусе гибридном вызывал ВЖМФ.



Рис. 55. Зеленая мозаика и яркий хлороз листа *Faba bona* (изолят из гладиолуса гибридного)

Итак, в последние годы в ДФО на декоративных культурах – аюкубе японской, ирисе гибридном, гладиолусе гибридном и тигридии павлиньей – идентифицирован ВЖМФ. Наши данные показали, что для ВЖМФ, поражающего декоративные культуры, характерно внутривидовое разнообразие. Выявленные 5 изолятов ВЖМФ – на аюкубе японской, тигридии павлиньей (обычный штамм), ирисе гибридном и два на гладиолусе гибридном (ВЖМФгл и ВЖМФгл/г) – имели свои индивидуальные особенности.

Считаем, что для поддержания на рынке цветов надлежащего фитосанитарного порядка необходим систематический контроль за ввозимыми декоративными растениями, важно определять заболевания и степень их развития, изучать биологию патогена и на основе изученных свойств разрабатывать профилактические и защитные мероприятия.

### *Тыквенный изолят вируса желтой мозаики фасоли*

В ДФО России из овощных культур возделываются в основном растения из семейств Тыквенные *Cucurbitaceae* (тыква, кабачок, огурец, арбуз, патиссоны и др.) и Пасленовые *Solanaceae* (томат, перец, баклажан, картофель и др.). При этом, как показал многолетний мониторинг, проводимый нами по выявлению фитовирусов в Приморском, Хабаровском краях, Камчатской и Сахалинской областях, наиболее вредоносными в посадках пасленовых и тыквенных овощных культур остаются ВТМ и ВОМ. Первый наносит вред главным образом пасленовым овощным культурам (томат, перцы, баклажаны), а ВОМ поражает чаще тыквенные овощные культуры (огурцы, тыквы и кабачки). Однако в последнее десятилетие в ДФО идентифицированы на тыкве, дыне и кабачках новые для России потивирусы – мозаики арбуза 1 (ВМА 1) и ВЖМФ на тыкве. Если ВОМ вызывает на молодых листьях растений тыквенных овощных культур, как правило, яркую хлоротичную крапчатость, то ВМА 1 – хлоротичную мозаику (Gnutova, Tolkach, 2000), в ВЖМФ из тыквы – различные мозаики.

Мутационный процесс в популяциях изучаемых нами ВТМ, ВОМ и ВЖМФ происходит весьма интенсивно, следствием чего является их большое количество вариантов в ДФО. В настоящее время по литературным данным известно более 60 штаммов ВОМ и 300 штаммов ВТМ. Только на юге Приморского края идентифицирован свыше 10 штаммов ВТМ, идентифицировано большое количество изолятов ВОМ и ВЖМФ (наряду с известными 6 штаммами ВЖМФ) с индивидуальными особенностями по биологическим свойствам (Гнутова, Толкач, 2003; Гнутова, 2005).

Семейство *Cucurbitaceae* широко распространено в мире и включает 100 родов и 580 видов растений (Cohen, Nitzany, 1963), что имеет важное экономическое значение. Но пищевую ценность для человека имеют только 12 видов (арбуз обыкновенный *Citrullus vulgaris*; огурцы – ангийский *Cucumis angularia* и посевной *C. sativus*; тыквы – гигантская *Cucurbita maxima*, смешанная *C. mixta*, мускусная *C. moschata*, поудная *Lagenaria sicerata*; кабачок *C. pepo*; лuffа остроробрая *Luffa acutangula* и ци-



линдрическая *L. cylindrica*; мексиканский огурец *Sechium edula*). Кроме того, из 6 родов (*Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*, *Luffa* и *Sechium*) только 4 рода (*Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Lagenaria*) наиболее часто используются человеком как ценные пищевые культуры.

Известно, что фенотипические, физические, антигенные и другие свойства вирусных частиц определяются функцией генома. Поэтому классические методы идентификации вирусов позволяют получить достоверные данные об индивидуальных особенностях вируса как вида.

Методом электронной микроскопии в исходном образце тыквы выявлены нитевидные частицы длиной 700–750 нм, характерные для вирусов рода *Potyvirus* (рис. 56).

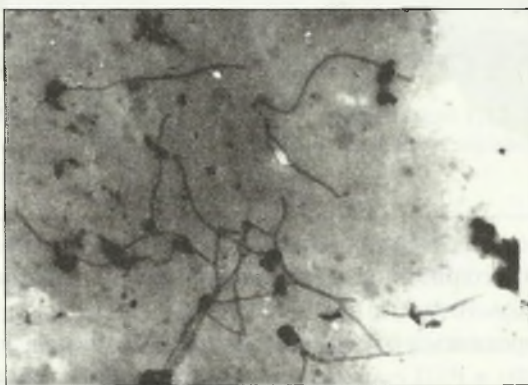


Рис. 56. Электронная микрофотография частиц изолята ВЖМФ из тыквы  
( $\times 10000$ )

Инокулировали 33 вида и сорта растений из семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Вирус заражал растения только из трех семейств: *Chenopodiaceae* (у мари амброзиевой *Ch. ambrosoides* на натертых листьях возникали локальные некрозы), *Cucurbitaceae* (кабачки *C. pepo* сортов Черный красавец и Аэронавт реагировали на заражение хлоротичной крапчатостью молодых листьев, а сорт Тиволи – посветлением жилок; тыква крупноплодная *C. maxima* – слабой хлоротичной крапчатостью), *Fabaceae* (у донника белого *M. albus* и пажитника сенного *Trigonella foenum-graecum* отмечены хлороз жилок и деформация (рис. 57Б); у фасоли обыкновенной *Ph. vulgaris* cvs. Golubka и Perlicka – хлоротичная мозаика и деформация листьев; у лобии *Dolichos lablab*, донника лекарственного *M. officinalis*, донника индийского *M. indicus* – хлоротичная штриховатость, а у донника белого *M. albus* наблюдали хлороз жилок и деформация листьев; бобы конские *F. bona* отвечали на инфицирование зеленым окаймлением главной и средней жилок с последующим хлорозом жилок (рис. 57А).



Рис. 57. А – системное окаймление жилок листа *Faba bona*, инфицированного изолятом ВЖМФ из тыквы; Б – симптомы на листьях растения *Trigonella foenum-graecum*, вызванные ВЖМФт, слева – лист здорового растения (Б)



Б

Физические характеристики исследуемого вируса были получены следующие: ТТИ – 70–75 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 5 сут.

Вирус легко передавался механически и тлей *M. persicae*.

Реакция ВЖМФт в РДД с антисывороткой против ВОМ (наиболее распространенного вируса на тыквенных овощных культурах) была отрицательной, что свидетельствовало о моноинфекции, присутствующей в изучаемом образце тыквы.



Рис. 58. Околоядерные X-тела в клетках растений *Faba bona*, инфицированных изолятом ВЖМФ из тыквы (показаны стрелкой)

В световом микроскопе методом Гольдина (1963) во всех клетках эпидермиса бобов конских, зараженных ВЖМФт, выявлены типичные для вирусов рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae* околоядерные включения – X-тела, которые появлялись одновременно с первичными симптомами болезни (рис. 58).

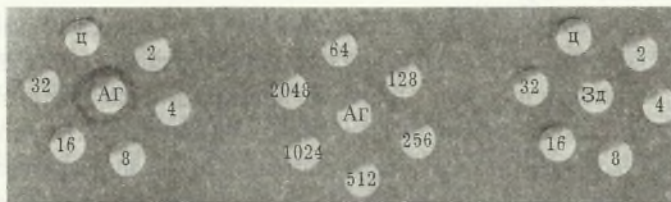
Получен очищенный препарат вируса по применяемой нами ранее методике для изолята ВЖМФ из гладиолуса гибридного (Гнутова, 1993). Для накопления вируса использовали бобы конские. Препарат вируса отличался высокой степенью очистки, что было подтверждено методами электронной микроскопии, электрофорезом и спектрофотометрически. Максимальный выход вируса составил 15,3 мг на 100 г инфекционного материала. Чистоту вирусно-



го препарата от присутствия других вирусов контролировали методом электронной микроскопии.

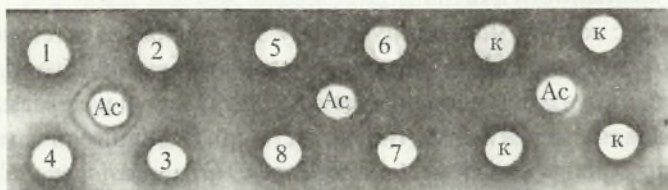
Была определена м.м. белка ВЖМФт, которая составила 32–34 кДа для основного белка. Отмечали наличие нескольких полипептидных зон, при хранении препарата вируса наблюдался частичный протеолиз основного белкового компонента.

К вирусу были получены поликлональные крысиная и кроличья антисыворотки с титром в КА – 1:512 и по результатам РДД – 1:64–1:256. Вирус проявил себя как умеренный иммуноген (рис. 59).



**Рис. 59.** Титр антисыворотки к изоляту ВЖМФт по результатам РДД. В центральных лунках: Аг – очищенный препарат ВЖМФт, Зд – сок здорового растения; в периферических – разведения антисыворотки

При изучении антигенных взаимоотношений вируса с другими представителями рода потивирусов показано в РДД антигенное родство с УВК, ВГТ и ВМА 1, что свидетельствовало о принадлежности изолята ВЖМФт к роду *Potyvirus*. Причем наряду с идентичными эпитопами капсидных белков изолят вируса имел свои индивидуальные антигенные детерминанты (рис. 60).



**Рис. 60.** Антигенные взаимоотношения ВЖМФт с другими потивирусами. В центральной лунке – Ас к ВЖМФт, в периферических – Аг: 1, 4, 5 – ВЖМФт, 2 – ВЖМФк, 3 – ВЖМФая, 6 – ВМА, 7 – ВГТ, 8 – УВК, К – сок здорового растения

По литературным данным, тыквенные овощные культуры поражаются следующими специфичными вирусами – огуречной мозаики *Cucumber mosaic cucumovirus*, струящейся мозаики огурца *Cucumber squirting mosaic virus*, зеленой крапчатой мозаики огурца *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus*, мозаики арбуза 1 и 2 *Watermelon mosaic potyvirus 1* и *2*, мозаики белой брiony *Bryony white mosaic virus*, кольцевой пятнистости папайи *Papaya ringspot potyvirus*, желтой мозаики цуккини *Zucchini yellow mosaic virus*, желтой крапчатости цуккини *Zucchini yellow fleck potyvirus*, мо-

заики тыквы *Squash mosaic potyvirus*, некроза огурца *Cucumber necrosis virus*, пожелтения жилок огурца *Cucumber vein yellowing virus*, некроза жилок дыни *Muskmelon vein necrosis virus*, некротической пятнистости французской дыни *French muskmelon necrotic spot virus*, некротической пятнистости дыни *Muskmelon necrotic spot virus*, а также неспецифическими вирусами – кольцевой пятнистости табака *Tobacco ringspot neporovirus*, мозаики резухи *Arabis mosaic nepovirus*, кольцевой пятнистости томата *Tomato ringspot nepovirus*, табачной мозаики *Tobacco mosaic tobamovirus*, желтой мозаики фасоли *Bean yellow mosaic potyvirus* и некроза табака *Tobacco necrosis necrovirus* (Provvidenti, Uyemoto, 1973).

Из вышеперечисленных вирусов к роду *Potyvirus* относятся только 5: мозаики арбуза, желтой мозаики цуккини, кольцевой пятнистости папайи, желтой мозаики фасоли и желтой крапчатости цуккини. Принимая во внимание полученные выше нами данные, исследуемый изолят можно было отнести к одному из пяти упомянутых потивирусов. Однако экспериментальный круг растений-хозяев вируса мозаики арбуза 1 ограничен только видами растений семейства *Cucurbitaceae*, а вирус мозаики арбуза 2 имеет довольно широкий круг экспериментально поражаемых растений, включающий растения из более 9 семейств и инфицирующий около 150 видов. Эти результаты не соответствовали нашим данным, поэтому мы не смогли отнести исследуемый изолят ни к одному из двух вирусов мозаики арбуза.

Вирус желтой крапчатости цуккини обнаружен только в Италии и заражает исключительно виды растений семейства *Cucurbitaceae*. У механически поражаемых этим вирусом растений кроме системной реакции обязательно присутствуют на инокулированных листьях некрозы (исключение горлянка *Lagenaria* sp.). Исследуемый нами изолят вируса не вызывал подобных симптомов. В результате его нельзя отнести к вирусу желтой крапчатости цуккини.

В Европе вирус желтой мозаики цуккини у зараженных в естественных и экспериментальных условиях растений вызывает очень суровые симптомы поражения: карликовость растений, измельчение листьев с последующими некрозами и деформацией, некроз плодов и семян, в итоге – гибель растений. Восприимчивыми к этому вирусу являются растения из семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*. Отличительной особенностью этого вируса от других видов рода потивирусов, поражающих растения семейства *Cucurbitaceae*, является то, что вирус желтой мозаики цуккини заражает локально гомфрену шаровидную *Gomphrena globosa*. Мы подобных данных не получили.

Вирус кольцевой пятнистости папайи заражает только виды растений семейства *Chenopodiaceae* и многие виды растений семейства *Cucurbitaceae*. Этот вирус пока еще не обнаружен на российской территории. Наши данные показывают, что его стоит исключить из списка вирусов, поражающих в ДФО растения тыквы. Вирус, выявленный нами на тыкве, по результатам электронной микроскопии, по антигенным, физико-химическим свойствам капсидных белков и физическим свойствам вирионов, а также по способности передачи тлями отнесен нами к роду *Potyvirus*. При



этом следует принять во внимание два важных критерия о принадлежности патогена к определенному виду, которыми являются симптоматика и экспериментальный круг растений-хозяев. Анализируя литературные и наши экспериментальные данные, мы пришли к выводу, что по биологическим свойствам вирус, обнаруженный на тыкве, можно с уверенностью отнести к вирусу желтой мозаики фасоли. Он как по симптоматике, так и по кругу поражаемых растений наиболее близок итальянским штаммам Z 1 и Z 2 этого вируса, которые выявлены на кабачках *Cucurbita pepo* и заражают также огурцы *Cucumis sativus*, горох посевной *Pisum sativum*, мари – *Ch. amaranticolor*, *Ch. quinoa* и фасоль антильскую *Ph. angularis* (Lovisolo, 1972). Дальневосточный тыквенный изолят ВЖМФ, как и итальянские штаммы ВЖМФ, заражает виды растений только трех семейств: *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, вызывая на растениях неяркую хлоротичную мозаику и крапчатость.

Кроме того, изучаемый нами тыквенный изолят ВЖМФ отличается по биологическим свойствам от изученных ранее в Приморском крае изолятов этого вируса, обнаруженных на сое, клевере, фасоли и гладиолусе (Чуян и др., 1984; Поливанова, Крылов, 1985; Толкач, Гнутова, 1999).

Таким образом, впервые на Дальнем Востоке России на тыквенных овощных культурах идентифицирован вирус желтой мозаики фасоли. По внутривидовому разнообразию этот изолят ВЖМФ можно отнести к итальянским штаммам Z 1 и Z 2, идентифицированным из цуккини. Пока отмечены единичные случаи заражения этим вирусом тыквенных овощных культур, однако, учитывая, что юг Дальнего Востока имеет муссонный климат и жесткий инфекционный фон, создаются уникальные условия для его быстрого распространения на этих теплолюбивых растениях.

### *Изоляты ВЖМФ, поражающие бобовые культуры*

Известно, что вирус является одним из самых распространенных на бобовых растениях и способен вызывать массовое заболевание бобовых культур – клеверов, бобов конских, сои, люпинов, чины душистой, гороха посевного. Впервые он был обнаружен и описан на фасоли в США в начале 30-х годов прошлого столетия (Price, 1935). Как упоминалось выше, в ранних исследованиях по изучению круга заражаемых вирусом растений было показано, что из 135 видов растений, восприимчивых к ВЖМФ, 121 вид относился к семейству бобовых и только 32 вида к другим семействам (Ковачевски, 1972). В литературе описано большое число изолятов и штаммов вируса, поражающего бобовые культуры. В качестве примера приведем наиболее оригинальные из них. Выделен штамм из бобов, который вызывал симптомы скручивания листьев, тогда как типичный штамм – только мозаику (Wilson, Roland, 1973). Р. Гроган (Grogan, 1948) описал штамм, приводящий к деформации плодов фасоли. В Нидерландах обнаружили изолят ВЖМФ, вызывающий некротическую реакцию на листьях гороха посевного (Beszner et al., 1976). Выявлен изолят ВЖМФ из красного клевера (Taraku, 1979), который имел характерные вирусные включения в форме

X-тел и ТТИ – 60–65 °С, ПРС –  $10^{-4}$ , ПСИ – 3–4 сут. Суровый штамм из белой фасоли вызывал появление энаций, подавление роста, некроз листьев, деформацию стручков и иногда преждевременную гибель растения (Tatchell et al., 1985). Изолят из сои сорта *Black* имел ТТИ – 55–60 °С, ПРС –  $10^{-3}$ , ПСИ – 7 сут. Вирус передавался механически и тлей (Rocchan, Iwaki, 1978). На Украине выявили 5 изолятов вируса на люпине белом *L. albus* и клевере луговом *Tr. pratense*, различающихся по времени и месту образования вирусных включений, кругу восприимчивых растений, проявлению симптомов и физическим свойствам вирионов (Баратова, Краснова, 1974). В средней полосе России идентифицировали ВЖМФ из гороха посевного, вики яровой *Vicia sativa*, бобов конских, фасоли обыкновенной и сои культурной. Изоляты вируса отличались друг от друга по кругу тест-растений и физическим свойствам вирионов (Поливанова, Жук, 1981). На сое ВЖМФ вызывал симптомы, отличные от тех, которые появлялись при заражении ВМС. Во второй половине вегетационного периода на растениях сои появлялись многочисленные мелкие точечные светло-зеленые крапинки. По мере старения листа пятнышки становились ярко-желтыми, а между ними сохранялись участки зеленой ткани, других изменений не происходило. Больные растения внешне не изменялись, они лишь слегка отставали в росте, но не в созревании. Вирус не передавался семенами, но передавался тлями и механической инокуляцией.

В агроценозах ДВ России ВЖМФ выявлен на клеверах *Trifolium hybridum*, *Tr. pratense*, которые являлись резерватрами вируса. В них он перезимовывал (Поливанова, 1968, 1975; Рейфман, Поливанова, 1969). Симптомы проявления вируса на растениях бобовых культур были от слабой желтой мозаики и хлоротичной крапчатости до деформации листьев и стеблей, некротизации и даже гибели растений. На листьях сои вирус чаще всего вызывал симптомы в виде светло-зеленой крапчатости, которая по мере старения листа становилась хлоротичной.

Приморский изолят ВЖМФ из фасоли обыкновенной. Для изучения круга растений-хозяев изолята из фасоли (ВЖМФ/п) инокулировались растения 34 видов и сортов из семейств: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Compositae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Все испытанные сорта фасоли реагировали на заражение. На 3 сортах фасоли – Pinto-14, Michelite, Черная спаржевая – после инокуляции на молодых листьях появлялся яркий хлороз жилок. Только у фасоли сорта Pinto образовывались локальные некрозы, а на более поздних стадиях развития растения развивался системный хлороз. Фасоль сортов Perlicka и Голубка отвечали системной реакцией, через 5–7 дней верхние листья приобретали мозаичную расцветку. У фасоли сорта Тор сор symptoms поражения проявлялись только в виде деформации листьев. У гороха посевного сортов Alaska и Perfection на молодых листьях наблюдалась крапчатость, а у клевера пунцового *Tr. incarnatum* – яркая хлоротичная мозаика, посветление жилок. Системная реакция развивалась после заражения и у пажитика сенного *Tr. fortium-graecum*. Однако наиболее четко симптомы поражения наблюдали на молодых листьях бобов конских на 4–5-й день в виде хлоротичной крапчатости, посветления жилок. Иногда растения задерживались в росте.

Вирус имел нитевидные частицы размером 720–760 нм.



ТТИ – 75–80 °С, ПСИ – 2 сут.

Показана передача ВЖМФф/п персиковой тлей. Процент семенной передачи у этого изолята вируса составлял: Черная спаржевая – 80 %, Prince – 50 %, Pinto – 6,6 %.

ВЖМФф/п отличался от типичного штамма ВЖМФ по некоторым биологическим свойствам, но главное отличие – узкий круг поражаемых растений. Удалось заразить только растения из семейства бобовых. Разница с другими бобовыми дальневосточными изолятами ВЖМФ отмечена по физическим свойствам вирионов.

Для дальнейшего изучения ВЖМФф/п был проведен сравнительный анализ его физико-химических и антигенных свойств с украинским (ВЖМФук), выделенным из растений бобов конских и любезно предоставленным академиком УАН А.Л. Бойко, и ВЖМФгл, впервые идентифицированным на ДВР на декоративных культурах.

Изоляты ВЖМФ накапливали в растениях бобов конских и выделяли по методике К. Маккоук с соавт. (Makkouk et al., 1982). Концентрацию вируса в препаратах определяли спектофотометрически по коэффициенту экстинкции = 2,4. Соотношение  $A_{260/280}$  для ВЖМФф, ВЖМФгл и ВЖМФук составляло 1,26; 1,21 и 1,21, концентрация вируса в препаратах на 100 г растительной массы – 4–6, 6–8 и 2–3 мг соответственно.

Электронно-микроскопические исследования показали в препаратах трех изучаемых изолятов ВЖМФ идентичные гибкие нитевидные частицы длиной 720–750 нм.

Электрофоретическим анализом в ПААГ вирусных белков в денатурирующих условиях, как мы упоминали выше для ВЖМФгл, были обнаружены некоторые различия (рис. 44). Гетерогенность белковых компонентов, скорее всего, была следствием действия на вирусные белки растительных протеаз. Наличие нескольких полипептидных зон можно также объяснить спонтанным преобразованием нативного структурного белка в более низкомолекулярный полипептид в результате хранения препарата. Подобный результат получали и другие исследователи при изучении физико-химических свойств потивирусов (Shukla et al., 1989). В нашем эксперименте расщеплению подвергся лишь белок ВЖМФф после двух мес хранения при 4 °С, в то время как два других изолята ВЖМФ оказались более стабильными.

Поликлональную кроличью сыворотку к ВЖМФф/п получали по нашей методике. Для иммуногенной и антигенной характеристики изолятов ВЖМФ использовались непрямой вариант и сэндвич-метод ИФА. По результатам непрямого варианта ИФА титр антисыворотки был 1:3600. Вирус оказался умеренным иммуногеном, но среди изучаемых трех изолятов ВЖМФ проявлял наибольшую антигенную активность. По расположению калибровочных кривых ИФА показал, что все изучаемые изоляты ВЖМФ имели антигенное родство, но наиболее близкородственными были дальневосточные изоляты, украинский изолят имел менее выраженную антигенную специфичность.

Таким образом, на фасоли обыкновенной выявлен вирус желтой мозаики фасоли.

Хабаровский изолят ВЖМФ из фасоли обыкновенной. Соком фасоли с симптомами хлороза жилок листа инокулировали растения 27 видов и сортов из семейств *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* (табл. 35). Удалось заразить только растения из двух семейств – *Chenopodiaceae* и *Fabaceae*.

Таблица 35

Реакция тест-растений на заражение хабаровским изолятом ВЖМФ из фасоли обыкновенной

Тест-растения	Симптомы поражения
<i>Ch. quinoa</i>	L: N
<i>Cucumis sativus</i>	—*
<i>Cucurbita pepo</i> , сорт Черный красавец	—
<i>C. pepo</i> var. <i>patisson</i>	—
<i>Datura stramonium</i>	—
<i>Dolichos lablab</i>	—
<i>Faba bona</i>	S: CIVE
<i>Lens culinaris</i>	—
<i>Medicago sativa</i>	—
<i>Melilotus albus</i>	S: CIM, CIStr, Rull
<i>N. glutinosa</i>	—
<i>N. tabacum</i> , cvs.: Samsun	—
Xanthi	—
<i>N. rustica</i>	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> , сорта: Perlicka	S: CIM, DisVe, Stu, SmLeaf
Изумрудная	S: CIMot, SmLeaf
Michelite	S: CIM
Cafeton	S: CIMot
Пионерская	—
Сапфир фиолетовый	—
Московская белая	—
Голубка	—
Red Kidney	—
Top crop	—
Valentina	—
<i>Pisum sativum</i> , сорт Сахарный	S: CIM
<i>Trifolium hybridum</i>	—
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	S: CIVE

\*Растение не заражалось.

Таким образом, экспериментально получено, что на листьях растения мари квиноа *Ch. quinoa* хабаровский изолят вируса (ВЖМФф/х) вызывал локальные некрозы, на бобах конских *F. bona*, фасоли золотистой *Ph. aureus*, пажитнике сенном *Tr. foenum-graecum* – яркий хлороз жилок. Горох посевной *P. sativum* сорта Сахарный реагировал



на заражение хлоротичной крапчатостью листьев, а донник белый *Melilotus albus* – темно-зеленой мозаикой. Вирусом были инокулированы растения 10 сортов фасоли обыкновенной *Ph. vulgaris*, но не все испытанные сорта реагировали на заражение. На молодых листьях 4-х сортов фасоли – Изумрудная, Perlicka, Cafeton и Michelite – вирус вызывал различные типы симптомов: мозаику, деформацию, хлоротичную крапчатость. Остальные сорта фасоли – Московская белая, Сапфир фиолетовый, Голубка, Пионерская, Valentina, Red Kedney – оказались устойчивыми к заражению изучаемым изолятом вируса. Кроме того, не удалось заразить вирусом такие виды растений из семейства *Fabaceae*, как клевер гибридный *Trifolium hybridum*, соя культурная *Glycine max* сорта Венера, фасоль *Ph. mungo*, лобия лаблаб *Dolichos lablab*, люцерна посевная *Medicago sativa*.

Физические свойства вирионов ВЖМФф/х: ТТИ – 70–75 °С, ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , ПСИ – 1 сут.

В препаратах, приготовленных методом погружения, в электронном микроскопе наблюдали нитевидные частицы размером 750–800 нм.

Вирус передавался тлей *M. persicae*. Это доказано экспериментально. На растения бобов конских была помещена тля, питавшаяся листьями. На 6-й день появились симптомы в виде яркого хлороза жилок.

Не подтверждена передача вируса через семена зараженных растений. В эксперимент брали семена *Ph. aureus* (тестировано 22 боба), *Ph. vulgaris* сорта Cafeton (5 бобов), *Pisum sativum* сорта Сахарный (32 боба), *F. bona* (23 боба). Визуально симптомов вирусного поражения на сеянцах выявлено не было, при просмотре в электронном микроскопе сока из молодых листьев сеянцев вирусные частицы также не обнаружены.

В эпидермисе листьев пораженных растений *F. bona* в световом микроскопе выявлены околядерные Х-тела.

Кроме того, в РДД исследуемый вирус проявил антигенное родство с антисыворотками против потивирусов ВМА, ВГТ, ВЖМФ и УВК, что свидетельствовало о принадлежности вируса к роду *Potyvirus*.

На основании литературных и собственных данных изолят вируса, выделенный в Хабаровском крае из фасоли обыкновенной, отнесен к вирусу желтой мозаики фасоли.

По биологическим свойствам ВЖМФф/х несколько отличался от приморского. У него ТТИ (70–75 °С) была ниже, чем у приморского (75–80 °С), ПСИ – у хабаровского изолята 1 сут, у приморского – 2 сут. ВЖМФп/ф не заражал растения из семейства *Chenopodiaceae*, тогда как ВЖМФф/х на листьях растения *Ch. quinoa* вызывал локальные некрозы. Тем не менее оба изолята ВЖМФ, выявленные на фасоли обыкновенной, имели узкий круг поражаемых растений по сравнению с обычным штаммом, для которого отмечен многими исследователями довольно широкий спектр экспериментально заражаемых растений. Из полученных данных видно, что ВЖМФф/х (впервые был обнаружен нами в Хабаровском крае) по своим свойствам близок к изоляту ВЖМФф/п.

Приморский изолят ВЖМФ из гороха посевного. Представляем результаты по идентификации вируса, обнаруженного на горохе посевном (ВЖМФгор) с симптомами хлороза жилок и хлоротичной крапчатости в Приморском крае.

В препарате, приготовленном из зараженного растения гороха, обнаружены гибкие нити длиной около 760–780 нм.

Для изучения экспериментального круга растений-хозяев использовались растения 36 видов и сортов 5 семейств: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Чувствительными к вирусу оказались только 8 из семейств *Chenopodiaceae* и *Fabaceae* (табл. 36).

Марь квиноа *Ch. quinoa* реагировала на заражение локальными точечными серыми некрозами, которые проявлялись после инокуляции на 3–4 сут. Вирусом заражались практически все используемые растения сортов гороха посевного *P. sativum*: Сахарный малыш, Вега, Фуга. Устойчивыми к заражению являлись только растения сорта Телеграф. У пораженных растений симптомы имели системный характер и проявлялись в виде хлоротичной крапчатости, хлоротичной мозаики, хлороза жилок и задержки роста растений. У фасоли обыкновенной *Ph. vulgaris* вирусом были инфицированы растения 7 сортов: Голубка, Московская белая, Изумрудная, Хавская универсальная, Perlicka, Michelite, Canadian wounder, Red Kidney и Top crop. Однако восприимчивыми к вирусу были только растения сорта Red Kidney, у которого реакция на заражение проявлялась в виде хлоротичной крапчатости листьев и карликовостью всего растения. На листьях пажитника сеного *Tr. foenum-graecum* вирусная реакция проявлялась в виде хлоротичной штриховатости, а растения донника белого *Melilotus albus* реагировали на заражение вирусом ярким хлорозом жилок и хлоротичной крапчатостью листьев. Одними из наиболее чувствительных тест-растений к изучаемому изоляту являлись бобы конские *F. bona*, которые отвечали на заражение хлоротичной крапчатостью и сильным скручиванием верхних листьев.

Физические свойства вирионов были: ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 1 сут.

Вирус довольно легко передавался с больных растений *F. bona*, *P. sativum* и *Ph. vulgaris* на молодые и здоровые этих же видов тлями *M. persicae*. На 7–9-й день на них появлялись симптомы вирусного поражения. Изучена семенная передача вируса. Проверено 25 семян зараженного *P. sativum*, визуально симптомов вирусного поражения не выявлено.

В эпидермисе листьев зараженных вирусом бобов конских выявлены типичные для вирусов рода *Potyvirus* околядерные вирусные включения.

По результатам РДД установлено антигенное родство изучаемого изолята вируса с другими потивирусами: УВК, ВГТ, ВЖМФ (тыквенный изолят) и ВМА 1.

Согласно литературным данным (Edwardson, 1974; Murayama, 1998), на горохе посевном в естественных условиях наиболее часто встречаются вирусы: мозаики гороха *Pea mosaic potyvirus (PMV)*, мозаики гороха, передающегося семенами, *Pea seedborn mosaic potyvirus (PSMV)*, некроза стебля гороха *Pea stem necrosis virus* (род не определен), штриховатости гороха *Pea streak carlavirus*, настоящей мозаики бобов *Broad bean true mosaic comovirus*, энационной мозаики гороха *Pea enation mosaic*



Реакция тест-растений на заражение изолятом ВЖМФ  
из растений гороха посевного

Семейство и тест-растение	Симптомы поражения	
	Локальные	Системные
<b>Amaranthaceae</b>		
<i>Amaranthus caudatus</i>	..*	—
<i>Celosia argentea</i>	—	—
<b>Chenopodiaceae</b>		
<i>Chenopodium quinoa</i>	L: N	
<b>Cucurbitaceae</b>		
<i>Cucurbita maxima</i>	—	—
<i>Cucumis sativus</i> , сорта: Восток	—	—
Логос	—	—
ДВ-6	—	—
Журавленок	—	—
<i>Cucurbita pepo</i> , сорт Грибовский	—	—
<b>Fabaceae</b>		
<i>Dolichos lablab</i>	—	—
<i>Glycine max</i>	—	—
<i>Faba bona</i>	—	S: CIMot, Rull
<i>Lens culinaris</i>	—	—
<i>Melilotus alba</i>	—	S: CIVe, CIMot
<i>Pisum sativum</i> , сорта: Сахарный малыш	—	S: CIMot, CIVe, Stu
Телеграф	—	—
Vera	—	S: CIMot
Фура	—	S: CIM
<i>Phaseolus vulgaris</i> , сорта: Perlicka	—	—
Изумрудная	—	—
Московская белая	—	—
Michelite	—	—
Canadian wonder	—	—
Голубка	—	S: CIMot, Stu
Red Kidney	—	—
Top crop	—	—
Хавская универсальная	—	—
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	—	S: CIStr
<b>Solanaceae</b>		
<i>Nicotiana rustica</i>	—	—
<i>N. tabacum</i> , cvs.: Samsun	—	—
Xanthi	—	—
<i>Nicandra physaloides</i>	—	—
<i>Petunia hybrida</i>	—	—

\*Растения не заражались.

*enatovirus*, раннего побурения гороха *Pea earlybrowning tobravirus*, скручивания листьев гороха *Pea leaf roll luteovirus*, слабой мозаики гороха *Pea mild mosaic comovirus*, зеленой крапчатости гороха *Pea green mottle comovirus*, бессимптомности гороха *Pea symptomless comovirus*, желтой мозаики фасоли *Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV)* и крапчатости гороха *Pea mottle potexvirus*.

Таким образом, горох заражают 3 потивируса: *PSMV*, *PMV*, *BYMV*. Известно, что в естественных условиях *PSMV* вызывает на горохе суровые симптомы в виде карликовости растений и скручивания всех листьев. Кроме того, этот вирус экспериментально заражает растения из 8 семейств: *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Aizoaceae*.

*PMV* также имеет широкий круг растений-хозяев, включающий растения семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Aizoaceae*. Однако этот вирус, как правило, не заражает экспериментально фасоль обыкновенную. Кроме того, вирус мозаики гороха вызывает отличные от других вирусов из рода *Potyvirus* симптомы: мраморность листьев, карликовость растения и задержку разворачивания листьев.

ВЖМФ, как правило, экспериментально поражает виды растений только двух семейств – *Fabaceae* и *Chenopodiaceae*. Причем, по литературным данным, симптомы на бобовых растениях проявляются в виде яркой хлоротичной крапчатости листьев и хлороза жилок (Granett, Provvidenti, 1975; Harrison, 1980). Подобную реакцию на заражение наблюдали и мы, при этом показали, что круг растений-хозяев этого изолята вируса ограничен только отдельными видами растений из семейства *Fabaceae* и одним видом *Ch. quinoa* из семейства *Chenopodiaceae* (табл. 36).

Данные по физическим свойствам вирионов соответствовали литературным: ТТИ – 65–70 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 1 сут.

Итак, наличие нитевидных частиц в препаратах, приготовленных из пораженных растений гороха изолятом ВЖМФ и просмотренных в электронном микроскопе, передача вируса тлями *M. persicae*, круг растений-хозяев вируса и симптомалогия, присутствие в эпидермисе листьев пораженных растений вирусных включений, характерных для вирусов рода *Potyvirus*, антигенное родство с некоторыми дальневосточными изолятами потивирусов – все это позволило считать его вирусом желтой мозаики фасоли.

Хабаровский изолят ВЖМФ из бобов конских был обнаружен с симптомами слабой хлоротичной крапчатости в Хабаровском крае в районе г. Комсомольск-на-Амуре. В препарате, приготовленном из листьев пораженных бобов конских, через электронный микроскоп выявлены нитевидные частицы размером около 700–720 нм, а через световой в эпидермисе листа бобов с симптомами вирусного поражения обнаружены околядерные включения, характерные для вирусов рода *Potyvirus*.

При изучении круга растений-хозяев вируса использовались растения 24 видов и сортов из семейств: *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* (табл. 37).

Чувствительными к заражению оказались только виды растений из семейства *Fabaceae*. Растения *F. bona* реагировали на заражение вирусом хлоротичной крапча-



Реакция тест-растений на заражение хабаровским изолятом ВЖМФ из бобов конских

Тест-растения	Симптомы поражения
<i>Ch. guinoa</i>	—*
<i>Cucumis sativus</i> , сорта: Журавленок	—
Уссурийский-3	—
<i>Cucurbita pepo</i> , сорт Грибовский	—
<i>C. pepo</i> var. <i>patisson</i> , сорт Зонтик	—
<i>Datura stramonium</i>	—
<i>Dolichos lablab</i>	—
<i>Faba bona</i>	S: CIMot, CISt
<i>Medicago sativa</i>	—
<i>Melilotus albus</i>	S: CIVe
<i>N. tabacum</i> , cvs.: Samsun	—
Xanthi	—
<i>N. rustica</i>	—
<i>Phaseolus aureus</i>	—
<i>Ph. vulgaris</i> , сорта: Perlicka	—
Пионерская	—
Московская белая	—
Red Kidney	—
<i>Pisum sativum</i> , сорт Фуга	—
<i>Trifolium hybridum</i>	—
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	S: CIVe
<i>Vigna unguiculata</i>	—

\*Растения не заражались.

тостью верхних листьев, на более поздних стадиях развивалась хлоротичная штриховатость, которая по мере роста растения становилась ярче. Симптомы на листьях растений *Melilotus alba* и *Tr. foenum-graecum* проявлялись на 7–8-й день в виде яркого хлороза жилок.

Для семенной передачи вируса экспериментально использовали семена растений *F. bona* (высажено 19 бобов), *M. alba* (32 семени), *P. sativum* сорта Сахарный (6 бобов). Визуально симптомов вирусного поражения на сеянцах не выявлено.

Вирус передавался тлями *M. persicae* с больного растения *F. bona* на здоровые — *Tr. foenum-graecum* и *F. bona*.

Изучены физические свойства вирионов хабаровского изолята из конских бобов (ВЖМФкб): ТТИ — 50–55 °С, ПРС —  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ — 1 сут.

В РДД изучаемый вирус реагировал с антисыворотками против потивирусов ВМА 1, ВГТ, УВК, ВЖМФ.

В естественных условиях бобы конские поражаются вирусами: крапчатости бобов *Broad bean mottle bromovirus*; некроза бобов *Broad bean necrosis furovirus*; сурового хлороза бобов *Broad bean severe chlorosisvirus*; окрашивания бобов *Broad bean stain comovirus*; настоящей мозаики бобов *Broad bean true mosaic comovirus*; увядания бобов *Broad bean wild fabavirus*; желтой кольцевой пятнистости бобов *Broad bean yellow ringspot virus*; пожелтения жилок бобов *Broad bean yellow vein cytorhabdovirus* и ВЖМФ.

Вирус, выявленный нами на бобах конских, на основании изученных нами свойств и литературных данных отнесен к вирусу желтой мозаики фасоли.

Приморский изолят ВЖМФ из клевера гибридного (ВЖМФк) обнаружен с симптомами яркого хлороза (Уссурийский район Приморского края) на *Trifolium hybridum*.

В электронном микроскопе в исходном растении наблюдались нитевидные частицы, характерные для ВЖМФ.

Реакция ВЖМФк в РДД с антисывороткой против ВОМ была отрицательной, но вирус положительно реагировал с антисыворотками против потивирусов ВЖМФт, ВГТ, УВК и ВМА 1.

ВЖМФк были заражены растения 30 видов и сортов из семейств *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*. Локально заражались растения *Ch. amaranticolor* (семейство *Chenopodiaceae*) и системно – *F. bona* (рис. 61), *Tr. foenum-graecum*, *Ph. vulgaris*, *Melilotus officinalis*, *P. sativum* cv. Ambrosia (семейство *Fabaceae*).

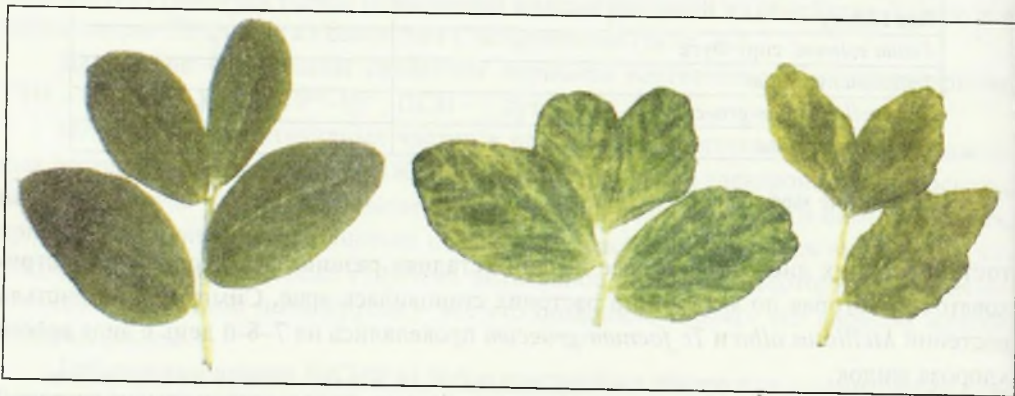


Рис. 61. Растения *Faba bona*, инокулированные изолятом ВЖМФ из клевера гибридного (справа); слева – листья здорового растения

Определены физические свойства вируса: ТТИ –  $>60 <65$  °С, ПРС –  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – 1сут.

Вирус легко передавался тлей *M. persicae*, но не выявлена передача ВЖМФк семенами растения пажитника сеного *Tr. foenum-graecum*.

Посевы клевера на территории ДФО в чистом виде или в смеси со злаковыми травами составляют основу кормовой базы животноводства и поэтому занимают не-



малые площади. По литературным данным, культивируемые виды клевера *Trifolium hybridum*, *T. pretense*, *T. repens* и др. поражаются вирусами растений. Клевер наиболее часто заражается следующими вирусами: энации клевера *Clover enation nucleorhabdovirus*; желтой мозаики клевера *Clover yellow mosaic potexvirus*; желтухи клевера *Clover yellow closterovirus*; пожелтения жилок клевера *Clover yellow vein potyvirus*; раневых опухолей клевера *Clover wound tumor phytoreovirus*; прижилковой мозаики красного клевера *Red clover vein mosaic carlavirus*; краснолиственности подземного клевера *Subterranean clover red leaf luteovirus*; некротической мозаики красного клевера *Clover red necrotic mosaic dianthovirus*; латентным вирусом клевера инкарнатного *Crimson clover latent nepovirus*; крапчатости красного клевера *Red clover mottle comovirus*; мозаики белого клевера *White clover mosaic potexvirus*; огуречной мозаики *Cucumber mosaic cucumovirus*; обыкновенной мозаики фасоли *Bean common mosaic potyvirus* и ВЖМФ.

Изучение возбудителей вирусных болезней клеверов представляет интерес и для однолетних бобовых растений, для которых клевер служит источником вирусной инфекции. На ДВ России на растениях клевера красного были обнаружены альфамавирус мозаики люцерны, потивирус желтой мозаики фасоли (Поливанова, 1977), потивирус мозаики клевера горного, потексвирус мозаики белого клевера, потивирус обыкновенной мозаики клевера (Гнутова, Толкач, 2001). По данным Станюлиса с соавт. (1980), ВОМ наиболее часто в Литве встречался на растениях красного, белого и гибридного клевера. Причем литовские изоляты ВОМ на многолетних бобовых растениях были более патогенны, чем на однолетних. ВОМ имел очень широкий круг поражаемых растений не только среди растений семейства бобовых, но и других семейств. Реже выявлялся вирус мозаики люцерны. В Литве из красного клевера выделено 2 изолята этого вируса, которые в отличие от ВОМ вызывали четкие местные некрозы на фасоли и системную реакцию на *Ch. quinoa* и *Ocimum basilicum*, и вирус прижилковой мозаики красного клевера (длина частиц – 650 нм). Последний, правда, встречался довольно редко. На исходных растениях он вызывал у клевера хлороз жилок и прижилковой ткани листьев разной степени интенсивности, у гороха – карликовость растений и посветление жилок листьев. Фасоли этим вирусом не поражались. Вирус обыкновенной мозаики гороха *Pea mosaic potyvirus* (длина вирионов – 650 нм) встречался довольно часто. Авторами выделено много изолятов вируса из красного и гибридного клеверов. Симптомы проявления вируса – отчетливая мозаика на листьях растений гороха и бобов, фасоль вирусом не заражалась. Вирус не вызывал системного поражения тест-растений за пределами семейства бобовых. ВЖМФ выделен из растений красного и гибридного клеверов. Встречался довольно часто. В отличие от вируса мозаики гороха вызывал сильную мозаику в виде окаймления жилок на листьях гороха и бобов, на фасоли – симптомы четкой желтой крапчатости, мозаики и деформации листьев.

По литературным и нашим экспериментальным данным, изучаемый нами изолят вируса из клевера гибридного можно отнести только к ВЖМФ. Его отличительная особенность – узкий круг поражаемых растений.

Итак, наши данные свидетельствуют о довольно широком распространении ВЖМФ в ДФО на бобовых культурах. Им поразились соя, горох посевной, клевер красный и гибридный, фасоль обыкновенная, бобы конские. Причем дальневосточные бобовые изоляты ВЖМФ по биологическим свойствам были близки между собой, но главная их отличительная особенность от уже описанных в литературе изолятов ВЖМФ заключалась в том, что все они имели узкий круг поражаемых растений.

На ДВ России в конце прошлого столетия уже было выявлено 6 изолятов ВЖМФ, один – на гладиолусе гибридном (Чуян и др., 1984) и 5 – на бобовых культурах (сое, горохе, клевере красном, фасоли, бобах конских) (Поливанова, 1968). Поэтому мы имели возможность сравнить по физическим свойствам ранее изученные изоляты ВЖМФ с изолятами ВЖМФ, идентифицированными нами в последние годы (табл. 38).

Таблица 38

## Физические свойства вирионов дальневосточных изолятов ВЖМФ

Изоляты ВЖМФ из:	ТТИ, °С	ПСИ, сут	ПРС
гладиолуса (ВЖМФ <sub>гл</sub> )	65–70	5	–
сои*	55–60	> 3	10 <sup>-3</sup> –10 <sup>-5</sup>
акубы японской	70–75	2	10 <sup>-4</sup>
тигридии павлиньей	65–70	1	10 <sup>-4</sup>
гладиолуса (ВЖМФ <sub>гл/г</sub> )	50–55	< 1	10 <sup>-1</sup> –10 <sup>-2</sup>
ириса (ВЖМФ <sub>и</sub> )	55–60	< 1	10 <sup>-6</sup> –10 <sup>-7</sup>
тыквы (ВЖМФ <sub>т</sub> )	70–75	5	10 <sup>-4</sup> –10 <sup>-5</sup>
гороха <sup>†</sup>	65–70	1	10 <sup>-1</sup> –10 <sup>-5</sup>
клевера красного*	55–60	2	10 <sup>-2</sup> –10 <sup>-4</sup>
фасоли обыкн. (ВЖМФ <sub>ф/п</sub> )	75–80	2	–
фасоли обыкн. (ВЖМФ <sub>ф/х</sub> )	70–75	1	10 <sup>-1</sup> –10 <sup>-2</sup>
бобов конских (ВЖМФ <sub>кб</sub> )	50–55	1	10 <sup>-3</sup> –10 <sup>-4</sup>
клевера гибридного (ВЖМФ <sub>к</sub> )	60–65	1	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-6</sup>
гороха посевного (ВЖМФ <sub>гор</sub> )	55–60	3	10 <sup>-5</sup> –10 <sup>-6</sup>
бобов конских (укр. изолят)**	–	–	–
Типичный штамм***	55–60	2–3	10 <sup>-3</sup> –10 <sup>-4</sup>

\* По: Поливанова, 1968. \*\* Украинский изолят использовали для сравнительной характеристики физико-химических и антигенных свойств капсидных белков ВЖМФ. \*\*\* По: Occure, 1980.

Сравнительный анализ индивидуальных особенностей двух изолятов, выявленных из гладиолуса гибридного, но в разные годы, показал, что эти изоляты ВЖМФ имеют свои индивидуальные особенности. Так, ВЖМФ<sub>гл/г</sub> отличался по биологическим свойствам от ВЖМФ<sub>гл</sub>, изученным нами в 80-е годы (Чуян и др., 1984; Гнутова и др., 1989). Последний имел более широкий круг поражаемых растений и заражал



не только растения из семейства бобовых – конские бобы, клевер пунцовый, люпин белый, два вида чины – пурпурную и красную, но также и три вида мари – квиноа, амарантоцветную и многосеменную. Отличались эти изоляты и по физическим свойствам вирионов.

Подобные отличия мы наблюдали и при изучении свойств изолятов из клеверов (красного и гибридного) и двух изолятов ВЖМФ из фасоли обыкновенной, обнаруженных нами в последние годы в Приморском и Хабаровском краях.

Данные, полученные нами, и литературный анализ, позволяют сделать некоторые обобщающие выводы. Раньше в ДФО встречались единичные растения главным образом из семейства бобовых, пораженные ВЖМФ. Однако в последнее десятилетие вирус получил довольно широкое распространение и на декоративных растениях, а также впервые выявлен на тыквенных овощных культурах. Кроме того, во время маршрутных обследований вирус довольно часто встречался на клеверах, которые являются резервуарами его в природе. На бобовых культурах в Приморском и Хабаровском краях выявлены изоляты вируса из фасоли обыкновенной, гороха посевного, бобов конских и клевера гибридного. По биологическим свойствам тыквенный изолят ВЖМФ отличался не только от дальневосточных изолятов вируса, обнаруженных на бобовых и декоративных культурах, но и от обычного штамма ВЖМФ. По классическим критериям идентификации он оказался близок к итальянским штаммам Z 1 и Z 2, выявленным на растениях цуккини. На декоративных культурах – ирисе гибридном, гладиолус гибридном, аукубе японской и тигридии павлиньей – впервые выявлены изоляты ВЖМФ, имеющие внутривидовые отличия по биологическим свойствам.

Изоляты ВЖМФир и ВЖМФгл/г показали себя как изоляты с четкими индивидуальными особенностями внутри вида. Это относится и к изоляту ВЖМФ из аукубы японской. По своим свойствам этот изолят отличался от обычного штамма ВЖМФ и изолятов вируса, выявленных ранее в ДВ, главным образом от бобовых, по экспериментальному кругу растений-хозяев. Они были узкоспециализированными и ограничивались только отдельными видами из семейства *Fabaceae*. По этим причинам ВЖМФая мы не отнесли к обычному штамму вируса. Вероятнее всего, он является новым штаммом ВЖМФ. Однако эту гипотезу можно будет подтвердить только молекулярными методами при изучении его генома. ВЖМФир и ВЖМФ гл/г по биологическим свойствам также значительно отличались от обычного штамма. Круг поражаемых растений у обычного штамма включает растения из 3–9 семейств, и симптомы заражения проявляются в виде системной мозаики на листьях. ВЖМФир и ВЖМФгл/г инфицировали только растения из семейства *Fabaceae*, и растения отвечали на заражение различными симптомами системного характера – хлоротичной крапчатостью и деформацией листьев, хлоротичным окаймлением и хлорозом жилок листа, задержкой роста растения. Данные по физическим свойствам вирионов этих изолятов ВЖМФ также отличались. Так, если у обычного штамма ТТИ – 55–60 °С, ПСИ – 2–3 сут, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ , то у ВЖМФир ТТИ – 55–60 °С, ПСИ – менее суток, ПРС –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ , у ВЖМФгл/г ТТИ – 50–55 °С, ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , ПСИ – менее суток.

Полученные нами данные показывают их отличия не только от обычного штамма, но и между собой.

Изолят ВЖМФ из тигридии павлиньей (ВЖМФтп) по сравнению с изолятом ВЖМФая имел более широкий круг поражаемых растений. Экспериментально удалось заразить растения из семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, которые, как правило, поражаются обычным штаммом ВЖМФ. Показатели физических свойств вирионов ВЖМФтп также совпадают с данными для обычного штамма ВЖМФ (Brunt, 1995). На основании полученных результатов вирус, обнаруженный на тигридии павлиньей, отнесен нами к обычному штамму ВЖМФ.

Итак, изученные нами дальневосточные изоляты вируса по антигенным свойствам были близки между собой, но имели, по сравнению с описанными в литературе и типичным штаммом ВЖМФ, узкий круг растений-хозяев, вызывали на растениях симптомы как локального, так и системного характера и отличались по физическим свойствам вирионов.

### Вирус мозаики гиппеаструма *Hippeastrum mosaic virus*

Заболевание на гиппеаструме, вызываемое вирусом мозаики гиппеаструма (ВМГ), впервые описано Л. Кункелем (Kunkel, 1922). Позже изучением этого вируса занимались другие зарубежные исследователи (Holms, 1928; Brants, Heuvel, 1965; Макутенайте-Навалинскене, 1981) и наш российский фитовирусолог А.Е. Проценко (Protcenko E., Protcenko A., 1962).

В естественных условиях вирус встречается только у видов растений семейства *Amarillidaceae* Juss. Механическим путем ВМГ передается нескольким видам растений из семейств *Amaranthaceae* Juss., *Chenopodiaceae* Vent., *Solanaceae* Juss. Из 30 видов растений, испытанных на возможность заражения, прореагировали на вирусную инфекцию только *Hippeastrum hortorum* Maatsch., *G. globosa* L., *Chlorophytum spesies* L., *Lycopersicon. esculentum* (Just) Mill. Из них системно реагируют на заражение ВМГ лишь гиппеаструм гибридный – на листьях, а иногда и на цветоножках больных растений появляются чередующиеся между собой светло- и темно-зеленые штрихи или пятна с неровными краями. На цветках симптомы отсутствуют, но иногда образуются темные непросвечивающиеся пятна. Цветоносы теряют зеленую окраску, становятся почти белыми. В период цветения больные растения почти не отличаются от здоровых, поэтому очень трудно определить болезнь, которая появляется в латентной форме. В результате в растении вирус присутствует из года в год. Симптомы варьируются в зависимости от времени поражения и стадии развития растения. У растений других семейств ВМГ вызывает образование хлоротичных и некротических локальных пятен 2–4 мм в диаметре через 2–3 нед после заражения (Brants, Heuvel, 1965; Leeuw, 1972 а, б; Brunt, 1973; Чуян, Крылов, 1975 а; Макутенайте-Навалинскене, 1981).

Диагностические виды: *Hippeastrum hortorum* (системная хлоротичная штриховатость на листьях), *G. globosa* и *Ch. murale* (локальные некротические некрозы), *Hyosajamus niger* (локальные некрозы).



Вирус легко передается соком и сохраняется в луковицах больных растений. О возможности передачи ВМГ насекомыми и через семена сведения в литературе противоречивы. Одни авторы считают, что вирус не передается через семена, другие имеют противоположную точку зрения (Briertley, 1948; Brants, Heuvel, 1965), в то время как некоторые утверждают, что передать ВМГ можно только с помощью тлей, другие считают – с помощью клещей (Traub, 1958; Brants, Heuvel, 1965).

А.Е. Проценко и Е.Е. Проценко (Protchenko E., Protchenko A., 1962) описали симптомы на листьях больного гиппеаструма – светло-зеленые узкие штрихи, а в препарате из сока этого растения наблюдали слабо изогнутые частицы длиной 500–550 нм. Другие авторы сообщали иные данные о размере ВМГ, характерные для вирусов рода *Potyvirus*: 750 × 12 нм (Brunt, 1973), 643 × 24 нм (Brants, Heuvel, 1965), 648–772 нм (Leeuw, 1972 a), 600–800 нм (Iwaki, 1967), 500–550 нм (Макутенайте-Навалинскене, 1981).

По данным М. Макутенайте-Навалинскене (1981), ТТИ – 70 °С, ПРС – 10<sup>-2</sup>, ПСИ – более сут, по другим данным, ТТИ – 55–70 °С, ПРС – 10<sup>-2</sup>–10<sup>-4</sup>, ПСИ – 1–4 сут (Билай и др., 1988).

В клетках растений, зараженных ВМГ, наблюдали внутриклеточные включения типа pinwheels, трубчатые и пластинчатые (Edwardson, 1966). Вирусные включения были рассеяны внутри цитоплазмы, формируя плотные агрегированные массы.

Распространен вирус главным образом в европейских странах.

При фитосанитарном исследовании декоративных растений в производственном тресте зеленого хозяйства г. Находка Приморского края на листьях отдельных растений *Hippeastrum hortorum* были обнаружены вирусоподобные симптомы – яркая хлоротичная штриховатость. Позже растения гиппеаструма с подобными симптомами были отмечены во многих хозяйствах Хабаровского и Приморского краев, где выращивали декоративные культуры и изучены биологические свойства вирусного патогена (Чуян, Крылов, 1975 а; Толкач, 1989).

При изучении круга растений-хозяев оказалось, что дальневосточный изолят ВМГ успешно заражал растения 4 видов: *Hippeastrum hortorum*, *H. niger*, *Chenopodium murale*, *G. globosa*, из них только у последнего растения заболевание приобретало системный характер. Растения *N. clevelandii* Gray., *Ch. quinoa* Willd., *Tetragonia expansa* Murr. не реагировали на заражение. Электронно-микроскопическим методом вирусные частицы в листьях этих растений также не были обнаружены. Растение гомфрена шаровидная через 3 нед после инокуляции реагировала появлением красных некротических пятен, переходящих в коричневые некрозы 2–4 мм в диаметре с малиновым окаймлением. Дальневосточный изолят ВМГ несколько отличался от типичного штамма и от других ранее описанных в литературе изолятов вируса тем, что имел более узкий круг поражаемых растений (Brunt, 1973).

Вирус передавался с помощью тлей *Myzus persicae* Sulz. В растениях гиппеаструма, выращенных из семян зараженных растений, в отличие от литературных данных, частицы ВМГ в электронном микроскопе не были обнаружены (наблюдения велись в течение года), что свидетельствовало об отсутствии семенной передачи вируса.

В.Ф. Толкач удалось механически заразить здоровые растения гиппеаструма. Через 1–2 мес после инокуляции на листьях появились симптомы в виде светло- и темно-зеленой штриховатости.

Дальневосточный изолят вируса имел следующие параметры физических свойств: ТТИ – в пределах 65 °С, ПСИ *in vitro* – 1 сут.

В электронном микроскопе были видны длинные нитевидные частицы, а в световом микроскопе – вирусные включения в клетках инфицированных вирусом растений характерные для потивирусов (рис. 62).



Рис. 62. Вирусное включение (показано стрелкой), индуцируемое вирусом мозаики гиппеаструма

По биологическим свойствам и по морфологии частиц вирус был предварительно отнесен к потивирусу мозаики гиппеаструма.

Для более точной идентификации вируса были изучены некоторые физико-химические, антигенные и иммуногенные свойства дальневосточного изолята ВМГ, а также установлено антигенное родство с другими видами *Potyvirus* в РДД и ИЭМ.

Для получения очищенного вирусного препарата использовали свежесорванные листья гиппеаструма с ярко выраженными симптомами вирусного поражения. Испытывали 3 методики получения очищенного препарата вируса (по: А. Brunt, 1973; В.К. Новиков и др., 1982; Е.В. Артюкова и др., 1988). По 1-й методике для гомогенизации листьев применяли 0,1 М цитрат натрия, рН 7,2, с добавлением ЭДТА и 2-меркаптоэтанола. Осветление сока проводили низкоскоростным центрифугированием и четыреххлористым углеродом. Вирус осаждали ПЭГ и 2 циклами дифференциального центрифугирования. 2-я методика включала гомогенизацию растительного материала с 0,05 М фосфатным буфером, рН 7,5, с ЭДТА и 2-меркаптоэтанола и низкоскоростное центрифугирование. От белков растения-хозяина освобождались доведением рН вирусной суспензии до 7,6–7,8. Осветление сока проводили тритоном X-100, вирус осаждали ПЭГ и подвергали высокоскоростному центрифугированию с использованием сахарозной подушки. По 3-й методике свежесорванные листья гиппеаструма гомогенизировали аналогично второй методике. Но для осветления гомогената применяли бутанол, хлороформ и тритон X-100. Из суспензии вирус дважды осаждали ПЭГ.



Концентрация вируса в препарате, полученном по 1-й методике, составила 1 мг на 100 г листьев. Препарат содержал примеси клеточных белков, поэтому минимум и максимум поглощения в УФ области света графически были выражены нечетко. С помощью электронного микроскопа наблюдали нитевидные частицы как в препарате, так и в надосадочной жидкости после осаждения вируса.

При 2-й методике был получен препарат с концентрацией вируса 2,7 мг/мл. Соотношение  $A_{260/280} = 1,4$ . Минимум поглощения соответствовал оптической плотности  $A_{245}$ , максимум –  $A_{260}$ . Препарат получили без примесей, но поскольку листья гиппеаструма содержат большое количество вязких веществ, считаем более эффективным использование для экстрагирования вируса цитратного, а не фосфатного буфера.

3-я методика была нами несколько изменена, так как метод был длителен по времени выделения вируса и связан с его большими потерями во время очистки. Второе осаждение вируса ПЭГ заменили 2 циклами дифференциального центрифугирования. В результате получили препарат, концентрация вируса в котором – 5,7 мг/мл и соотношение  $A_{260/280} = 1,4$ . Минимум поглощения был при оптической плотности  $A_{245}$  и максимум – при  $A_{260}$ . Выход вируса в среднем составил 30 мг на 1 кг листьев растений *Hippeastrum hybridum*. Препарат использовали для иммунизации кроликов.

Пептидное картирование белка ВМГ электрофорезом в ПААГ в присутствии ДСН выявило гетерогенность капсидного белка вируса. Были определены м.м. нативного белка (30 кДа) и продуктов его деструкции (28 кДа) в условиях хранения вирусного препарата при 4 °С в присутствии азида натрия.

Измерение частиц в очищенных препаратах вируса и непосредственно в препаратах из сока листьев зараженных растений гиппеаструма показало, что длина частиц варьируется от 500 до 700 нм, что связано с гомогенизацией материала и дальнейшими обработками в процессе выделения. В соке из листьев зараженных растений модальная длина частиц была 720–750 нм, ее мы считаем истинной длиной частиц ВМГ (рис. 63).

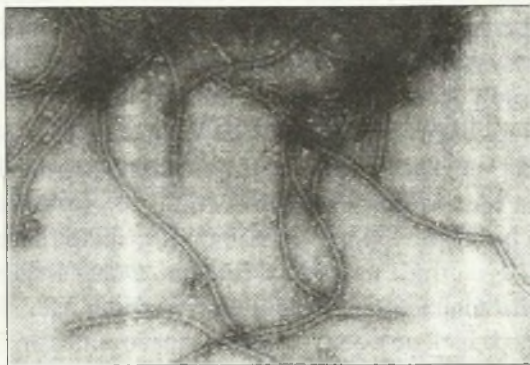


Рис. 63. Электронная микрофотография вирионов вируса мозаики гиппеаструма

При получении специфической антисыворотки была применена следующая схема иммунизации: 1-й день – введение 0,5 мг вируса с адьювантом Фрейнда в несколько точек по боковым линиям тела кролика вдоль позвоночника в/к; 7-й – 0,5 мг вируса с адьювантом в/м; 30-й – 0,5 мг вируса в/в. На 40-й день проводили четвертую иммунизацию аналогично первой.

Разведение специфической антисыворотки в непрямом варианте ИФА было 1:250–1:500, антивидового конъюгата – 1:100 (0,125 мкг/мл пероксидазы). Антигены наносили в диапазоне концентраций 1 мкг/мл – 0,1 нг/мл, разведение сока зараженных растений –  $10^{-1}$ – $10^{-6}$ . В качестве субстрата использовали 0,05 %-ный ортофениленамин в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере. По результатам непрямого метода ИФА получены данные о концентрации ВМГ как в препарате, так и в соке зараженных растений, что соответствовало 15–20 нг и  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  (разведение инфекционного сока). Определена концентрация ВМГ в инфекционном соке листьев гиппеаструма, которая была 0,67 мг/мл.

Использовался метод иммунной электронной микроскопии (ИЭМ) с целью проверки специфичности полученной антисыворотки и определения антигенных взаимоотношений ВМГ с другими дальневосточными изолятами потивирусов: УВК, АВК, ВЖМФ, ВМС, ВЖКЛ, ВМК и ВМТ. Декорирование вирионов проводили гомологичными и гетерологичными антителами. Для повышения сорбции частиц электронно-микроскопические сеточки покрывали белком А (Serva, FRG) по методу Д. Шаклы и К. Гоуха (Shukla, Gough, 1979).

ВМГ проявлял средние иммуногенные свойства. Максимальный титр специфических антител в РДД – 1:128. Так как по размерам вирус не проходит через поры агара, перед постановкой РДД в соки и препараты, которые использовали как антигены, добавляли 0,1 % ДСН для разрушения частиц. В непрямом методе ИФА титр антисывороток соответствовал 1:16000–1:32000.

При определении в РДД антигенного родства ВМГ с другими потивирусами, идентифицированными на ДВ России, было показано, что вирус (1 мг/мл) в соке и препарате взаимодействовал с антителами к УВК, ВЖМФ, ВЖКЛ и ВМТ. Данные ИЭМ подтвердили результаты РДД: частицы ВМГ при просмотре в электронном микроскопе очень плотно покрывались антителами гомологичной антисыворотки (4+) и слабо декорировались антителами ВЖМФ и УВК (рис. 64). Однако вирионы ВМГ почти не сорбировали на своей поверхности антитела против ВЖКЛ, ВТБ, ВМТ и АВК, но реагировали с антителами против ВМС на 3+, что свидетельствовало об их близком антигенном родстве. При исследовании препаратов из сока растений гиппеаструма выявляли 2–3 частицы на ячейку сеточки. Обработывая сеточки белком А, нам удалось увеличить количество наблюдаемых частиц в электронном микроскопе в среднем в 100 раз по сравнению с сеточками, необработанными белком А. Результаты ИЭМ показали, что для ВМГ характерно наличие в капсидном белке родоспецифичных эпитопов, которые указывали на близкое антигенное родство с УВК, ВМС и ВЖМФ.



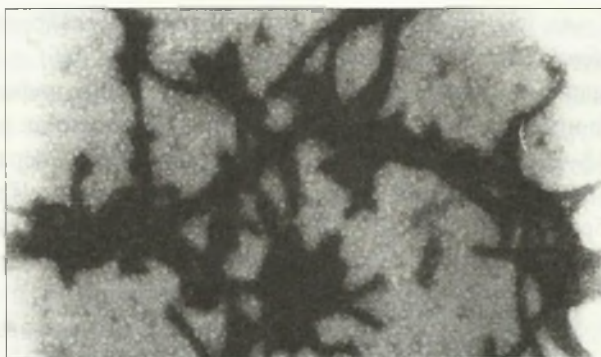


Рис. 64. Электронная микрофотография вирионов ВМГ, декорированных специфическими антителами в ИЭМ

Итак, данные, полученные в процессе изучения антигенных, физико-химических и биологических свойств нового для российского ДВ изолята ВМГ, подтвердили его принадлежность к виду *Hippeastrum mosaic virus* рода *Potyvirus*.

#### А-вирус картофеля *Potato virus A*

Нитевидные частицы А-вируса картофеля (АВК) имеют размеры вирионов  $730 \times 11-15$  нм и по размерам и форме практически не отличаются от УВК – другого потивируса, поражающего картофель.

Вирус способен заражать свыше 50 видов растений семейства пасленовых. Так, на картофеле симптомы значительно отличаются в зависимости от штамма и сорта. Наиболее характерными признаками заболевания, вызываемого АВК, являются слабая или обыкновенная мозаика и разнообразная деформация листьев (волнистость, курчавость и складчатость), обусловленная выпуклостью между жилковыми участками ткани. Иногда на листьях заметна крупнопятнистая мозаика. Есть сорта картофеля, у которых некоторые штаммы вируса не вызывают видимых симптомов (латентная форма инфекции). Другие же реагируют некрозом верхушки, после чего АВК распространяется вниз по растению и может вызывать гибель растения (например, это характерно для картофеля сортов Эпикур, Кинг Эдвард, Сако и др.). Клубни таких растений часто некротизируются. Концентрация АВК в листьях и клубнях обычно невысокая. Снижение урожая от АВК незначительно (10–15 %), но при комплексном действии вирусов на растение (АВК+УВК+ХВК) вредоносность его усиливается и потери могут составлять до 40 %, а в отдельных случаях до 60–80 % (Блоцкая, 2000).

Круг растений-хозяев небольшой. Это различные виды табаков – *N. clevelandii*, *N. tabacum* cvs. Samsun, Xanthi, White Burley, *Nicandra physaloides* (системное поражение, часто бессимптомное), а также томаты *Lycopersicon pimpinellifolium* (Just) Mill.

(появление на листьях темных некрозов с последующим проявлением системной реакции), *Solanum demissum*, *S. tuberosum* cv. Aquila (гибрид А-6) и *S. chacoense* Вип. (ТЕ-1 и ТЕ-2). В нашем эксперименте томаты реагировали на инфекцию лишь в том случае, если после инокуляции растение помещали в затемненное место на 3–5 дней при температуре 18–20 °С. Через 1–1,5 нед после заражения на верхних листьях растений появлялись некрозы, спустя 2–2,5 мес – слабая мозаика. Из-за высокой восприимчивости гибридов А-6, ТЕ-1 и ТЕ-2 ко многим другим вирусам для инокуляции использовались листья, которые закладывались во влажные кюветы. Непременные условия для проявления реакции – круглосуточное освещение и температура 22–24 °С. Некрозы образовывались на 3–5-й день. Гибрид А-6 реагировал звездчатыми, а ТЕ-1 и ТЕ-2 – обычными некрозами (рис. 65).



Рис. 65. Некрозы на листьях *Solanum chacoense* после заражения АВК

Вирус распространяется главным образом тлями по непersistентному типу, а также контактным путем, механически, прививкой. Следует отметить, что механически передача соком в экспериментальных условиях бывает не всегда удачной, по-видимому, из-за низкой концентрации вируса в тканях больного растения.

ТТИ – 44–52 °С, ПРС –  $5 \times 10^{-2}$ , ПСИ – 12–24 ч (Klinkowski, Kegler, 1962).

Учитывая все трудности, которые испытывает исследователь при получении очищенного препарата АВК, мы применили следующую методику выделения вируса: свежесорванные листья *N. tabacum* cvs. Samsun, Xanthi или *N. clevelandii* на 25–30-й день после инокуляции быстро гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,4–7,6, с добавлением 0,005 М ЭДТА и 0,1 %-ной тиогликолевой кислоты. Все процедуры по очистке выполняли в холодной комнате при 3 °С. Инфекционный сок



осветляли тритоном X-100 (1 % от общего объема вирусосодержащей жидкости). Из осветленных экстрактов вирус осаждали 4–5 %-ным ПЭГ и 0,3 М NaCl. Для экстрагирования осадков использовали 0,3 М глициновый буфер, pH 8,5. Завершающими этапами были 2 цикла дифференциального центрифугирования и ступенчатый градиент плотности (40, 30, 25 %-ный хлористый цезий). Чистоту препарата контролировали просмотром в электронном микроскопе (рис. 66). Отношение экстинкций  $A_{260/280} = 1,3$ . Выход вируса – 20–30 мг/кг.

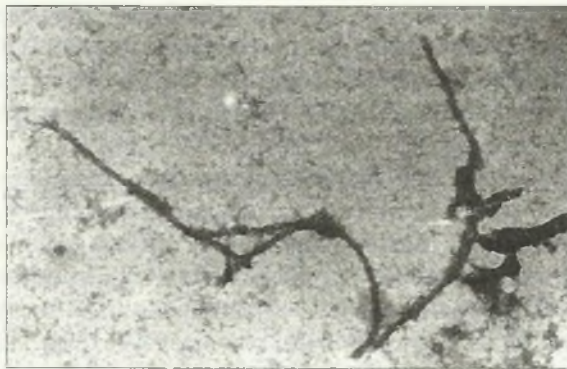


Рис. 66. Электронофотограмма А-вируса картофеля

Выделенные препараты вируса обладали слабой иммуногенной активностью. Вирус вводили трехкратно – в/к, в/м с адьювантом Фрейнда и в/в. Доза иммуногена за 1 инъекцию – 500 мкг. Титр специфических антител в РДД – 1:16, ИФА (непрямой вариант) – 1:10240, КА – 1:256–1:1024.

Методами РДД, РИЭФ, ИФА и ИЭМ обнаружено очень близкое антигенное родство АВК с УВК, а также выявлены идентичные эпитопы с ВМС, ВМТ, ВЖМФ, ВЖКЛ и ВТБ (рис. 67).

Итак, выявлены характерные особенности дальневосточного изолята АВК. Отмечены слабо выраженные иммуногенные свойства АВК и его лабильность при выделении, вирус накапливался в тест-растении в низкой концентрации, что создавало определенные трудности при получении очищенного препарата вируса. Однако как антиген АВК довольно хорошо реагировал в иммунохимических реакциях со специфическими антителами. Это позволило нам выявить антигенное родство эпитопов капсидного белка вируса с другими потивирусами.

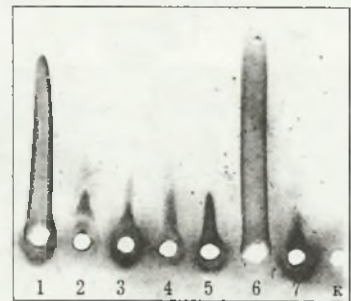


Рис. 67. Выявление РИЭФ родоспецифических эпитопов капсидных белков у дальневосточных изолятов потивирусов в системе Ас к А-вирусу картофеля. В геле – Ас в разведении 1:30. Концентрация Аг – 1 мг/мл: 1 – ВМС, 2 – ВЖМФ, 3 – ВЖКЛ, 4 – УВК, 5 – АВК, 6 – ВМТ, 7 – ВТБ, к – сок здорового растения

Y-вирус картофеля *Potato virus Y*

**Физико-химические и физические свойства.** Вирионы Y-вируса картофеля (YVK) имеют нитевидную форму размером  $750 \text{ нм} \times 11 \text{ нм}$ , коэффициент седиментации  $S_{20,W} = 145 \text{ S}$ , плавучая плотность в CsCl –  $1,326 \text{ г/см}^3$ .

РНК вируса имеет м.м.  $3,1\text{--}3,2 \text{ мДа}$  и составляет 6 % массы вируса. Полипептид оболочки – 33 кДа.

**Липиды и углеводы** не обнаружены (Vokx de, Huttinga, 1981).

Первоначально аминокислотный состав и м.м. белка оболочки были изучены с помощью электрофореза в ПААГ. Оказалось, что белок оболочки (БО) состоит из 286 аминокислотных остатков (Moghal, Francki, 1976; 1981). Shukla с соавт. (1986) определили первичную структуру белка оболочки YVK (обычный штамм) и показали, что он состоит из 267 аминокислотных остатков (м.м. 29,945 кДа).

**Антигенные свойства.** Иммуногенность капсидных белков вируса определяется штаммовой принадлежностью. Многочисленные штаммы вируса разделены на три основные большие группы по симптомам на табаке: YVK<sup>0</sup>, YVK<sup>N</sup> и YVK<sup>C</sup>. Первые два штамма – средние иммуногены, YVK<sup>C</sup> – слабый. Штаммы вируса и многие виды рода *Potyvirus* имеют идентичные эпитопы (рис. 68). По антигенной специфичности не выявлено большой разницы между обычными и некротическими штаммами. К большинству, особенно к наиболее вредоносным и распространенным штаммам YVK, получены штаммоспецифические поликлональные и моноклональные антитела.

**Биологические свойства.** Круг растений-хозяев очень широк. Кроме десятков видов растений из семейства пасленовых YVK заражает многие растения из других семейств. Характер симптомов и степень их развития зависят от штамма вируса, сорта картофеля и условий его выращивания. Симптомы на растениях картофеля очень вариabельны. При первичной инфекции они на листьях выражены слабо или отсутствуют,

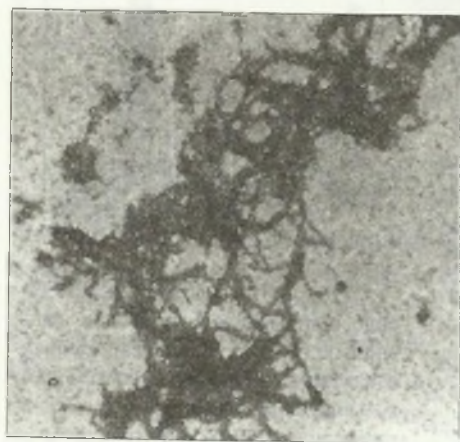


Рис. 68. Декорирование вирионов YVK антителами против АВК, выявленное ИЭМ

при вторичной инфекции встречаются ярко выраженная морщинистая мозаика или полосчатая мозаика. При *морщинистой мозаике* листья приобретают мозаичную расцветку и бугристую, морщинистую поверхность. Морщинистость листьев обусловлена усиленным разрастанием междужилковой ткани, при сильном поражении край листьев загибается книзу. *Полосчатая мозаика* проявляется после цветения и усиливается с развитием растения. Она вызывает образование некрозов по жилкам с нижней стороны листа в виде штрихов, полос и пятен. Черешки и листья приобретают хрупкость, на нижних листьях появляются угловатые темно-коричневые пятна. В дальнейшем некроз листьев, начиная с нижнего яруса, приводит к их отмиранию, и они повисают на



черешках. В результате у пораженных растений оголяется стебель, листья остаются только на верхушке и растение приобретает пальмообразный вид (рис. 69).

Иногда YBK присутствует в растениях в скрытой (латентной) форме или же в комплексе с другими вирусами, поражающими картофель, чаще всего с ХБК.

Диагностические виды: *Physalis floridana* Rybd. – поражается системно и реагирует на заражение на 25-й день образованием четких некрозов. Листья желтеют и опадают. На растении *N. tabacum* cv. Samsun обычные штаммы YBK<sup>0</sup> вызывают на листьях посветление жилок с последующим появлением крапчатости; YBK<sup>C</sup> на 15–20-й день после заражения вызывает слабую мозаику и пятнистость, а YBK<sup>N</sup> на 10–12-й день – некротизацию жилок листа и стеблей, прекращение роста растения и через некоторое время его гибель. Гибрид А-6 *Solanum demissum* Lindl. реагирует на YBK образованием коричневых некрозов со светлым центром. Растение заражается также системно.

В клетках, инфицированных вирусом растений, наблюдали вирусные включения, характерные для потивирусов.

Заболевание, вызываемое YBK, очень вредоносно, снижение урожайности – на 30–90 % (Анисимов, 2004). Из культурных растений YBK поражает картофель, перец, томаты, хризантемы и в ряде случаев снижает урожайность этих культур на 50 % (Бобкова и др., 1985; Шпаар, 2001). На ДВ России отмечено снижение урожайности картофеля от вируса на 50–80 % (Рейфман и др., 1996).

ТТИ в соке составляет 50–70 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 1–3 сут, в замороженных листьях вирус может сохраняться до года, а в высушенных – до 11 мес (Рейфман и др., 1971).

Вирус передается контактным путем от больных к здоровым растениям, при механической обработке посевов – через повреждения на ботве (при уходе за посадками) и на клубнях (при их уборке, переработке и посадке). Инфицированные семенные клубни картофеля – основной источник сохранения и распространения YBK в полевых условиях, а в естественных резервуарах и накопителях вируса являются виды дикой и сорной растительности семейства *Solanaceae*. YBK переносится неперсистентно многими видами тлей (около 20), в том числе *Myzus persicae*, *M. ornotus*, *Aphis rhamni*, *A. faba*, *A. frangulae*, *Macrosiphum euphorbiae* и др., но наиболее эффективно персиковой тлей *M. persicae*. В последние годы пока-



Рис. 69. Симптомы поражения картофеля YBK (из архива В.Г. Рейфмана)



зано, что в Ленинградской области вирус переносится бобовой, гороховой, крушинниковой и черемухозлаковыми *Rhopalosiphium padi*. Следует отметить, что последний вид, не характерный для энтомофауны картофельного поля, и черемухозлаковые тли не образуют колоний на картофеле при миграциях с зимних растений-хозяев, однако насекомые могут посещать растения картофеля и совершать пробные уколы, что увеличивает число зараженных растений (Созонов, 2005).

Передача вируса тлями происходит при участии специфического белкомощника, образующегося в инфицированных клетках при заражении УВК. Белкомощник с м.м.  $100-200 \times 10^3$  кДа кодируется (по крайней мере, частично) вирусным геном и обеспечивает прикрепление вирионов к ротовым органам тли.

Распространен вирус в регионах возделывания картофеля повсеместно. Эпифитотии УВК на картофеле периодически возникают в разных странах и регионах, в том числе и в Северо-Западном регионе России (Созонов, 2005). Их связывают с появлением новых вирулентных штаммов вируса.

### Штаммы УВК и их диагностика

В мире в настоящее время среди 40 вирусов, поражающих картофель, особо опасен УВК, так как он вызывает значительные потери урожая. Кроме того, УВК переносится большим числом тлей, включая виды, которые не заселяют посадки картофеля (Кюрдингер, Шпаар, 2000). Характерно для этого вируса и то, что некоторые его штаммы вызывают некрозы на клубнях, поэтому не только у семенного картофеля, но и у пораженного столового картофеля снижаются товарные качества (Вайдеман и др., 1999). Все это затрудняет селекцию на устойчивость и борьбу с этим вирусом. В последние годы у УВК наблюдается появление новых агрессивных штаммов, природа возникновения которых пока не ясна. В Америке эти штаммы известны давно (Smith, Dennis, 1940). Существует версия, что в Европу они попали с селекционным материалом из Америки (Lozernzen et al., 2006). В 50-е годы прошлого века в Европе быстро размножилась штаммовая группа УВК<sup>N</sup>, в 70-е годы – штаммы УВК<sup>N<sup>FN</sup></sup>, а в 90-е – УВК<sup>N<sup>W</sup></sup>. Сейчас известно несколько распространенных и вредоносных для картофеля штаммов УВК, структура и свойства генома которых основательно изучаются (Walsh et al., 2001; Crosslin et al., 2005; Glais et al., 2005; Lozernzen et al., 2006).

В прошлом веке на основании симптомов поражения растений картофеля и тест-растений выделено три основные группы штаммов (Bawden, Kassanis, 1957; Bokx de et al., 1975; Bokx de, Nuttinga, 1981): УВК<sup>0</sup> – обычные, УВК<sup>N</sup> – некротические, вызывающие суровый некроз жилок на табаке *N. tabacum*, а на физалисе флориданском *Ph. floridana* и картофеле *Solanum tuberosum* – более слабые симптомы по сравнению с УВК<sup>0</sup>; УВК<sup>C</sup> – вызывающие на картофеле *stripplle streak* и отличающиеся от остальных штаммов УВК отсутствием передачи характерным вектором УВК – *M. persicae*.

УВК<sup>0</sup> как самостоятельный вирус впервые был описан в 1931 г. (Smith, 1931). Он вызывает морщинистую и полосчатую мозаику. При первичной инфекции на жилках листьев картофеля, особенно с их нижней стороны, а также в уголках и между жилка-

ми образуются  
как листа хлоро  
нижних, засы  
полосчатой об  
жилок долей  
листья и стебл  
ненным среди  
УВК<sup>N</sup> эпиде  
Симптомы его  
сти, волнистос  
форме. Так как  
пространился  
мый и наиболее  
комплексной  
поверхность  
жилок. Листья  
ваются в посл

С эпидеми  
ских штаммов  
картофеле или  
УВК<sup>N</sup>, возник  
накопившийся  
страняется. По  
посадок семен  
ние УВК недос  
способом нево

Так как бо  
нями, то без  
строе снижен  
Даже при пере  
штаммы УВК  
ность. В этом

УВК<sup>C</sup> мал  
сообщил, что  
птомами моза  
их отмирание  
инфекция при  
ствительны к  
на картофеле  
характерное д

Наряду с  
На картофеле



ми образуются темно-коричневые штрихи и пятна за счет разрушения на этих участках листа хлорофилла. К концу вегетации растений почти все его листья, начиная с нижних, засыхают и повисают на стеблях. В последующих репродукциях наряду с полосчатой обнаруживается и морщинистая мозаика, происходит укорочение средних жилок долей листьев, их вершины отогнуты вниз. Больные растения отстают в росте, листья и стебли становятся хрупкими. В России  $YVK^O$  считается самым распространенным среди других штаммов вируса на картофеле.

$YVK^N$  впервые выявлен в Северной Америке в 1940 г. (Smith, Dennis, 1940). Симптомы его проявлялись в виде бугристости пластинок листьев, слабой крапчатости, волнистости их краев или же присутствовали в растениях картофеля в латентной форме. Так как слабые симптомы визуально трудно обнаружить, штамм быстро распространился. В Европе с 90-х годов прошлого века  $YVK^N$  – наиболее часто встречаемый и наиболее вредоносный на посадках картофеля штамм (Valkonen, 1994). При комплексной инфекции этого штамма с ХВК наблюдается морщинистая мозаика, поверхность листа становится морщинистой в результате разрастания тканей между жилок. Листья могут быть более мелкими, края их скручиваются. Симптомы усиливаются в последующие после заражения годы.

С эпидемиологической точки зрения особое значение имеет группа некротических штаммов  $YVK^N$ , представители которой вызывают только легкие симптомы на картофеле или латентное поражение. Вирусные эпидемии на картофеле, пораженном  $YVK^N$ , возникают в годы появления большого числа тлей-переносчиков, когда вирус, накопившийся в течение нескольких лет в картофеле, особенно сильно ими распространяется. Поэтому их трудно выявить при фиточистке. Визуального осмотра посадок семенного материала или делянок в грунт-контроле для анализа на поражение  $YVK$  недостаточно из-за латентной инфекции или маскировки. Кроме того, таким способом невозможно точно определить штаммовую группу  $YVK$ .

Так как большинство вирусов, в том числе и  $YVK$ , передается с больными клубнями, то без постоянной замены посадочного материала здоровым происходит быстрое снижение урожайности (так называемое вирусное вырождение картофеля). Даже при первой репродукции урожайность может снижаться на 25 %. Некоторые штаммы  $YVK$  образуют некрозы в клубнях, которые в результате теряют свою товарность. В этом отношении особенно опасен штамм  $YVK^{NTN}$ .

$YVK^C$  мало распространен. Впервые этот штамм описал Bawden (1936), который сообщил, что  $YVK^C$  не передается тлей *M. persicae*, как  $YVK^O$  и  $YVK^N$ . Наряду с симптомами мозаичности, пятнистости  $YVK^C$  вызывает на листьях картофеля некрозы и их отмирание, а на поверхности клубней могут быть некротические пятна. Иногда инфекция присутствует в латентной форме. Некоторые сорта картофеля суперчувствительны к  $YVK^C$ . По литературным данным, например, индийский изолят  $YVK^C$  на картофеле сорта Сако вызывал желтое окаймление жилок и скручивание листьев, характерное для МВК (Singh et al., 1983).

Наряду с этими штаммами в литературе описан  $YVK^{RBV}$ , открытый в 1935 году. На картофеле он вызывает симптомы крапчатости, посветление жилок, волнистость

листовой пластинки. Т.А. Шелабиной (1989) отмечено, что этот штамм был довольно широко распространен в 60–80-е годы прошлого века на посадках картофеля в Северо-Западной зоне России. В настоящее время в данном регионе характерных для данного штамма симптомов на растениях картофеля не обнаружено (Созонов, 2005). Автор делает предположение, что этот штамм в этом регионе отсутствует или в единичных случаях может встречаться в коллекционных посадках. В то же время на картофеле зафиксирован новый для региона некротический штамм YVK<sup>NW</sup>, впервые обнаруженный в соседней Польше на сорте Wilga (Chrzanowska, 1987, 1991; Blanco-Urgoiti et al., 1998). Характерной его особенностью является гомологичность аминокислотного состава с YVK<sup>O</sup> (на 99 %).

Некоторые авторы выделяют группу аномальных штаммов YVK<sup>Al</sup>. Выявлен штамм YVK, который обладает свойствами как YVK<sup>O</sup>, так и YVK<sup>RBV</sup>. В последние годы в Европе идентифицированы еще два штамма – YVK<sup>Z</sup> и YVK<sup>ZY</sup>, к счастью, они встречаются пока очень редко, потому изучены крайне слабо (Шпаар и др., 2007).

Помимо хорошо изученных штаммов YVK<sup>N</sup> (*necrotic strain*) и YVK<sup>O</sup> (*ordinary strain*) в Европе на картофеле в конце прошлого века выявили болезнь, вызывающую некротизацию клубней (*potato tuber necrotic ringspot disease*) (Beczner et al., 1984). Был выделен один из изолятов YVK (*tuber necrosis*), который способствовал образованию на клубнях картофеля кольцеобразных некрозов. Его отнесли к новой субгруппе и назвали YVK<sup>NTN</sup> (Le Romancer et al., 1994). Чуть позже группа пополнилась штаммом YVK<sup>NW</sup>, обнаруженным не только в Польше, но и во Франции (Glais et al., 1998) и Чешской Республике (Dedic, Ptacek, 2000). Сейчас этот штамм выявлен не только в большинстве стран Европы, но и в Северной Америке и Азии (Фолимонова и др., 1988). Считается, что в Европе в 20 % случаев заражение картофеля происходит обычным штаммом YVK<sup>O</sup>, в 80 % – некротическими штаммами YVK<sup>NTN</sup> и YVK<sup>N</sup>. В 2003 году на посадках картофеля в Швейцарии выявлен штамм YVK<sup>NW</sup> и штаммы в комбинации YVK<sup>O</sup>+ YVK<sup>N</sup>+ YVK<sup>NTN</sup>. В Германии доминируют два штамма – YVK<sup>NTN</sup> и YVK<sup>NW</sup>. Появление новых штаммов YVK затрудняет диагностику и борьбу с вирусом, а также селекцию на устойчивость (Вайдемман и др., 1999). Первичная инфекция не различается по разнообразию штаммов, но при повторном заражении выявляются новые штаммы YVK.

Итак, заболевание на картофеле *Potato tuber necrotic ringspot disease*, вызываемое штаммами субгруппы YVK<sup>NTN</sup>, впервые описанное в Венгрии (Beczner et al., 1984), широко распространилось сначала в Европе (Weidemann, Maiss, 1996), а затем в мире. Заражение проявляется в виде кольцевых некротических пятен вокруг глазков клубней, а на более поздних стадиях инфекции происходит их некротизация и усыхание. Штаммы YVK уже стали угрозой для картофелеводства во всем мире. В последние годы в связи с все возрастающим сортовым обменом картофеля появилась реальная угроза проникновения и распространения их на территории России. Особую опасность новые агрессивные штаммы некротической группы YVK представляют для ДФО, если учесть, что на его юге (Приморский и Хабаровский края) наблюдается самый агрессивный патогенный фон.



Большинство штаммов YBK имеют антигенное родство (Gugerli, Fries, 1983). Однако встречаются штаммы группы YBK<sup>C</sup>, такие как *gladblaadje* в Голландии, PVY<sup>C</sup>-AB в Северной Ирландии, PVY<sup>C</sup>-UFCIP в Южной Америке, которые до недавнего времени считались обособленными серотипами YBK (нетипичные штаммы). П. Гугерли и П. Фрайс (Gugerli, Fries, 1981), получив моноклональные антитела к YBK<sup>N</sup>, обратили внимание, что из 28 собранных со всего мира изолятов, включавших все разновидности штаммов YBK, с ними не прореагировали лишь 3 – нетипичные штаммы YBK<sup>C</sup>. Этот факт попытались объяснить С. Фриборг и Дж. Накашима (Fribourg, Nakashima, 1984) и Р. Джонес и Н. Фаллер (Jones, Fuller, 1984). Они пришли к заключению, что эти три штамма относятся не к YBK, а являются представителями нового потивируса YBK. Как и YBK, YBK легко выявляется специфической антисывороткой. Антитела против YBK не реагируют с YBK. Однако симптомы YBK на растениях табака сходны с симптомами, вызываемыми YBK<sup>O</sup>. В зависимости от того, какие особенности в распространении проявляет тот или иной штамм, можно судить о его агрессивности.

Штамм YBK<sup>NTV</sup>, вызывающий некрозы на клубнях, по антигенным свойствам неотличим от штаммов некротической группы YBK<sup>N</sup>. Отличия можно определить только с помощью ПЦР. Штамм YBK<sup>NW</sup> по антигенным свойствам также относится к YBK<sup>N</sup>, а по симптомам и по результатам ПЦР – к обычной группе штаммов YBK<sup>O</sup>. Их точная диагностика очень важна не только для селекции на устойчивость, но и в семеноводстве. Из изложенного следует, что в настоящее время (например, для YBK) недостаточно провести анализ семенного материала на уровне вируса, целесообразно это делать на уровне штамма.

В настоящее время на рынке для иммунодиагностики YBK имеется целый набор коммерческих антисывороток на основе моноклональных (МАТ) или поликлональных антител (ПАТ). Но, к сожалению, противовирусные антитела не всегда реагируют со всеми изолятами YBK (Гнutowa, 1993; Nataya et al., 1994). Причина в высокой вариабельности N-терминального участка белковой оболочки, которая определяет в основном антигенность вирусной частицы (иммунодоминантный участок). Но для селекции на устойчивость картофеля к вирусу необходимо иметь достоверный метод выявления вируса до уровня штаммов. Поэтому с 90-х годов у нас в России (Гнutowa, 1993), а затем в европейских странах стали проводиться исследования по получению штаммоспецифических и универсальных антисывороток на основе поли- и моноклональных антител, чтобы создать на их основе четкую и надежную иммунодиагностику для выявления различных штаммов YBK. Немецкие исследователи (Шуберт и др., 2004) после обнаружения генов устойчивости к YBK составили перечень сортодифференциаторов для идентификации штаммов YBK. Однако, по их данным, симптомы на растениях-дифференциаторах штаммов YBK не всегда четко проявляются. Кроме того, как правильно подчеркивают немецкие коллеги, биологическое тестирование – довольно дорогое исследование. Правда, сейчас некоторые фирмы предлагают МАТ к штаммам YBK<sup>N</sup>, YBK<sup>O</sup>, YBK<sup>O/C</sup>. Шуберт с соавт. (2004) для диагностики штаммов YBK применили двойной антительный сэндвич-метод ИФА (DAS-ELISA), используя МАТ – ASL-5H3, ASL-3E11, YBK-N, -O/C, -C (фирма Adgen) и ПАТ – козы

антитела PAS-ASL. Изолятами служили: PVY<sup>NTN</sup> 12/94, PVY<sup>NTN</sup> Ditta, PVY<sup>NTN</sup> Gm 99, PVY<sup>N</sup> Bi, PVY<sup>O</sup> LW, PVY<sup>NW</sup>, Dorbozy, PVY<sup>NW</sup> 28/97, PVY<sup>NW</sup> (Wi), PVY<sup>NW</sup>, изолят 5, PVY<sup>C</sup> 803, PVY<sup>C</sup> 2.3/2/Q4, PVY<sup>C</sup> 2.3/1/Q3, PVY<sup>N</sup> Ny, здоровый контроль (OD400HM, среднее из двух проб, растение-хозяин – *N. tabacum* cv. Xanti).

Результаты немецких коллег после испытания 13 МАТ показали, что МАТ ASL-5H3 распознает все исследуемые изоляты YBK, кроме PVY<sup>NTN</sup> 12/94. Чтобы получить положительный результат со всеми изолятами вируса в качестве антитела до его фиксации на микроплатах добавляли другие МАТ. Неожидано для исследователей было и то, что поликлональная козья антисыворотка, которая обычно использовалась для массовой иммунодиагностики, очень плохо распознавала два изолята YBK. При работе с коммерческими штаммоспецифическими МАТ фирмы Adgen получены в двух случаях положительные реакции, которых не следовало ожидать. Авторы предположили, что имеют дело не с моноинфекцией. Однако проверка с помощью иммуноспецифической обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с использованием специфических праймеров показала, что эти МАТ отличались нестрогой специфичностью. Интересен и тот факт, что изолят PVY<sup>N</sup>Ny положительно реагировал с обоими МАТ. Это может быть результатом смешанной инфекции или рекомбинации между N- и O-штаммами YBK. Приведенные данные немецких коллег показывают, как важен метод диагностики, особенно, если наблюдаются нечеткие внешние проявления вирусного поражения, что возможно ожидать в работе при отборе материала по селекции картофеля на устойчивость к YKB.

Немецкие исследователи, проанализировав полученные результаты, предложили следующий подход при идентификации изолятов YBK. Сначала необходимо с помощью антисыворотки определить наличие в растении YBK. Для этого анализируют, по крайней мере, по два проростка от каждого клубня, так как вирус часто неравномерно распределен в клубнях. Положительно реагирующие растения анализируют с помощью ИФА (методом двойного наслаивания МАТ, специфичных к обычной и некротической группам штаммов YBK). Одновременно соком, используемым в качестве антигена, заражают табак, не менее трех растений в каждом опыте. Через 10–15 сут регистрируются симптомы растений. Сильные некрозы листовых жилок указывают на поражение N-штаммом, включая YBK<sup>NTN</sup>. Они сопровождаются хлорозом и деформацией листьев. Часто некрозы проявляются только на нижней стороне листьев. Если одновременно серологическая реакция с YBK<sup>N</sup>-специфическими антителами положительна, а с YBK<sup>O</sup>-специфическими антителами отрицательна, проанализированный изолят является YBK<sup>N</sup>-штаммом. Слабые некрозы жилок листьев характерны для представителей PVY<sup>NW</sup>-штаммов. Эти изоляты реагируют только положительно с YBK<sup>O</sup>-специфическими антителами. Разные формы хлорозов, посветление жилок или деформация листьев без отсутствия некрозов жилок являются типичными симптомами при поражении табака обычными штаммами Y-вируса картофеля. Такие изоляты похожи на PVY<sup>NW</sup> и обычно реагируют с антителами к YBK<sup>O</sup>, но не к YBK<sup>N</sup>. Если изолят образует иммунный комплекс со специфическими антителами YBK<sup>C</sup>, то это штамм YBK<sup>C</sup>. При отсутствии реакции со специфическими МАТ против YBK<sup>O</sup> и



PVY<sup>NTN</sup> Gm 99,  
PVY<sup>NW</sup>, изолят 5,  
контроль (OD400HM,

что MAT ASL-  
4. Чтобы получить  
титела до его фикс-  
следователей было  
использовалась для  
шта YVK. При ра-  
получены в двух  
Авторы предполо-  
иммуноспе-  
с использова-  
неострой специ-  
реагировал с  
рекомбинации  
показывают,  
внешние про-  
отборе материала

предложили  
необходимо с помо-  
анализируют,  
неравно-  
анализируют с  
обычной и не-  
в качестве  
Через 10–15 сут  
указывают  
хлорозом и де-  
стороне листьев.  
антителами  
проанализиро-  
листья характерны  
положительно  
осветление жилок  
типичными сим-  
тофеля. Такие изо-  
YVK<sup>o</sup>, но не к YVK<sup>N</sup>.  
тителами YVK<sup>c</sup>, то  
MAT против YVK<sup>o</sup> и

YVK<sup>c</sup> можно предположить, что это изолят PVY<sup>NW</sup>. Однако при этом следует прове-сти биологическое тестирование. В этом случае обязательно появление слабых некрозов на листовых жилках на табаке и наличие положительной реакции с антителами к некротической группе штаммов. Если реакция отрицательна, то изучаемый изолят, по всей вероятности, относится к PVY<sup>NW</sup>. Однако на практике возникает целый ряд проблем. Самая большая из них, когда имеется в наличии смешанная инфекция. В этом случае сначала следует провести биологическое тестирование отдельных штаммов с помощью растений-индикаторов, реагирующих локально. Но это затратно. Другая проблема возникает, если симптомы или иммунохимические реакции отклоняются от стандартных вариантов. Так, изолят PVY<sup>Ny</sup> реагирует и с обычными, и некротическими специфическими MAT, но не реагирует ни на N-, ни на O-специфические праймеры в полимеразной цепной реакции (return transcription-polimerase chain reaction – RT-PCR). Изолированный в Германии в окрестностях г. Ашерслебен изолят 5 YVK вызывал сильные некрозы жилок листьев и даже стеблей на табаке, следовательно, являлся по биологическим свойствам N-штаммом, но серологически реагировал как O-штамм. В обоих случаях авторы посчитали, что имеют дело с рекомбинантами. Смешанные инфекции, по крайней мере в случае изолята 5 YVK, исключаются, так как его отбор проводили из локальных повреждений индикаторного растения.

Проблему представляет и идентификация NTN-штаммов, особенно если они встречаются в латентной форме. Так, Cerovska (1998) сообщила о получении PVY<sup>NTN</sup>-специфического моноклона. Но сейчас известно, что он распознает только отдельные штаммы PVY<sup>NTN</sup>-группы. Описанный метод (Weidemann, Maiss, 1996) для дифференциального анализа YVK<sup>N</sup>- и YVK<sup>NTN</sup>-штаммов основан на представлении, что YVK<sup>NTN</sup>-штаммы являются рекомбинантами из N- и O-штаммов. На участке 5'-конца вирусного РНК они нашли сегменты, которые были пригодны для дифференциации штаммов YVK<sup>N</sup> и YVK<sup>NTN</sup> с помощью RT-PCR. Позже были описаны специфические праймеры (Weilguny, Singh, 1998), однако Н. Бунхам с соавт. (Boonham et al., 2002 a) считают, что все праймеры локализованы в части гена для белковой оболочки. Праймеры других авторов амплифицируют сегменты из 5'-РНК до Р1-гена. Л. Глайс с соавт. (Glais et al., 2001) и Н. Бунхам с соавт. (Boonham et al., 2002 b) провели сравнительный анализ всех этих праймеров (табл. 39).

Результаты, представленные в табл. 39, указывают, что при анализе большого числа проб наблюдаются неспецифические реакции. Это касается и праймеров, полученных Н. Бунхамом с соавт. (Boonham et al., 2002 a) и представленных в верхней части таблицы. Позднее эти исследователи отмечали (Boonham et al., 2002 b), что некоторые изоляты YVK не распознавались праймерами, хотя и вызывали некротизацию клубней. Большинство ложных положительных результатов характерно было для PVY<sup>NW</sup>-штаммов, что не удивительно, так как они представляют рекомбинанты между YVK<sup>o</sup> и YVK<sup>N</sup>-штаммами. Как выше отмечено, PVY<sup>NW</sup>-штаммы у клубней некоторых сортов картофеля также могли вызвать некрозы.

Проблема, возникающая при диагностики штаммов YVK, состоит в том, что пока неизвестно, какой сегмент генома вируса отвечает за индукцию симптомов. По этому вопросу в литературе почти нет информации. Имеются предположения о том, что за

Сравнение пригодности различных праймеров для диагностики PVY<sup>NTN</sup>  
(по: Шуберт с соавт., 2004)

Автор анализа	Реакции	Авторы праймеров и амплифицирующиеся сегменты вируса			
		Weilguny & Singh, 1998, 5'-NTR-PI	Weidemann & Maiss, 1996, 5'-NTR-PI	Boonham et al., 2002 b, CP	Glais et al., 2001, 5'-NTR-PI
Boonham et al., 2002 b	Специфические	–	5/8	8/8	–
	Не специфич. +	–	1/4	0/4	–
	Не специфич. –	–	3/8	0/8	–
Glais et al., 2001	Специфические	24/24	24/24	13/24*	24/24
	Не специфич. +	37/44	15/44	1/44	14/44
	Не специфич. –	0/24	0/24	11/24	0/24

\*Число правильных или ошибочных результатов из числа анализируемых проб (Glais et al., 2001; Boonham et al., 2002 b)

это отвечают гены Nia и/или Nib-CP (Glais et al., 2002). Но в таком случае и дифференцирующие праймеры должны бы амплифицировать эти участки. Можно считать, что некрозы представляют собой неполную защитную реакцию, аналогичную установленной для вируса погрешности табака *Tobacco rattle virus* и вируса метельчатости верхушки картофеля *Potato mop-top virus*. Основная проблема для нахождения гена, отвечающего за образование некрозов, состоит в том, что пока секвенированы геномы только некоторых штаммов, например PVY<sup>NTN</sup>, поэтому затруднительно сравнивать по этим показателям остальные штаммы YVK, чтобы получить информацию об участке(ах), отвечающем(их) за индукцию некрозов. Разрешение проблемы осложняется и тем, что очень трудно создать клоны Y-вируса картофеля, сохраняющие инфекционность (Jakab et al., 1997). А они необходимы для доказательства ответственности соответствующих сегментов генома того или иного участка за индукцию симптомов. Единственный описанный инфекционный клон YVK отличался очень слабой инфекционностью, сильно мутировал и был основан на YVK<sup>N</sup>-штамме. Сегодня нетрудно переписать по всей длине РНК YVK в sDNA, но ее клонирование до сих пор не удалось. Из-за токсичности некоторых белков вируса, транслокация которых инициируется (криптическими) бактериальными промоторами вирусного генома, можно клонировать «детоксицированные» мутанты, которые не инфекционны или клонирование которых совсем не удастся. Возможно предположить, что системы клонирования на основе клеточных линий дрожжей или насекомых являются выходом из этой ситуации. У других представителей семейства *Potyviridae* установлено, что сегменты генома, отвечающие за вирулентность, находятся в VPg (Borgstrom, Johansen, 2001) или что HC-протеин отвечает за выражение симптомов поражения



Таблица 39

Элементы вируса	
Glais et al., 2001.	S <sup>+</sup> -NTR-P1
-	-
-	-
-	-
24/24	
14/44	
0/24	

(Redondo et al., 2001). Исходя из этого, можно сделать вывод, что почти каждый ген вируса способен отвечать за образование некрозов. Некоторые авторы считают, что и О- и N-штаммы могут при определенном генетическом происхождении хозяина вызывать некрозы на клубнях.

Итак, немецкие коллеги считают, что штаммы PVY<sup>NTN</sup> и PVY<sup>NW</sup> могут стать серьезной опасностью для картофелеводства. Известно, что штаммы PVY<sup>NTN</sup> вызывают некрозы на клубнях особенно у таких сортов, которые отличаются высокой устойчивостью к УБК (Boonham et al., 2002 a, 2002 b). Сообщения, что этими штаммами преодолевалась устойчивость, базирующаяся на гене *Rysto5*, пока не подтвердились. Но штаммы PVY<sup>NTN</sup> и PVY<sup>NW</sup>, очевидно, более вирулентны, чем типичные N-штаммы. Это показывают результаты анализа устойчивости польского сортимента картофеля к разным штаммам УБК (табл. 40), поэтому оба штамма инфицируют больше сортов среднего уровня устойчивости к УБК и имеют более высокий показатель экстинкции в ИФА, чем типичный УБК<sup>N</sup>-штамм.

Таблица 40

Реакция сортов польского сортимента картофеля на устойчивость к некоторым штаммам УБК (по: Kaczmarek, Mosakowska, 2001)

Оценка устойчивости*	Сорта	Реакция на штаммы УБК		
		PVY <sup>Ny</sup>	PVY <sup>NTN</sup>	PVY <sup>NW</sup>
9	Alicja, Ania, Klepra, Sante, Signal ... (всего 24 сорта, все имеющие ген <i>Rysto</i> )	ЭУ	ЭУ	ЭУ
8	Mors, Koga, Neptun, Rywal	СЧР	СЧР	СЧР
7,5...8	Pasja, Arkadia, Triada, Ikar	ВУ	ВУ	ВУ
7,5	Grot, Musa	ВУ	ВУ	СУ
7,5	Orlik, Ibis	ВУ	СУ	СУ
7,5	Aster, Bard	СУ	СУ	СУ
7	Irga	ВУ	СУ	УУ
7	Bila, Harpun, Wikind, Cukada, Drop	СУ	СУ	УУ
7...6,5	Glada, Aksamitka, Tokaj, Albina, Jantar, Rybitwa, Tara, Balbina, Cedron	ВУ	УУ	УУ
6,5...5	Denar, Lord, Zeus, Moll, Vineta, Wawarzyn Wigry, Wolfram, Karlana, Lawina, Oda, Kolia, Ruta, Irvs, Mila, Vital	СУ	УУ	УУ
5	Perkoz, Ditta, Rosalind, Zebra, Panda, Bryza, Satina, Gloria, Salto, Orlan, Accent, Felsina, Fresco, Latona, Timate, Lady, Clair	УУ	УУ	УУ

\*От 9 (самая высокая устойчивость) до 1 (очень высокая восприимчивость); критерии устойчивости: ЭУ – очень высокая (*Rysto*); СЧР – сверхчувствительная реакция; ВУ – высокая; СУ – средняя; УУ – умеренная до восприимчивости.

В дальнейшем предстоит получить ответ на вопрос, какое влияние оказывают климатические условия на возникновение некротических штаммов УВК. Есть мнение, что они чаще появляются при засушливой, теплой погоде, но, как показывает опыт немецких коллег, у чувствительных сортов, например у сорта Линда (Linda), они могут возникать и при дождливой, умеренно теплой погоде уже при первичной инфекции. Нельзя исключить, что существуют изоляты PVY<sup>NTN</sup>, различающиеся между собой по агрессивности. Отмечены и довольно большие различия в способности сортов к образованию некрозов (Kaczmarek, Mosakowska, 2001). Так, авторы статьи никогда не наблюдали некрозов у сорта Ханса (Hansa) и ряда сортов, созданных более ста лет тому назад. Сорт Витал (Vital) считается очень чувствительным к УВК<sup>NTN</sup>, а сорт Ролия (Rolia) с большой долей вероятности считается толерантным. Эти исследователи при проведении опытов со штаммами УВК<sup>NTN</sup> считают необходимым учитывать, что некоторые изоляты УВК могут реагировать на УВК<sup>NTN</sup>-штаммы, а это может исказить результаты опытов. Поэтому необходимо работать с изолятами, заранее «очищенными» растениями-хозяевами, дающими локальный тип симптомов. Для этого пригодны клоны тест-растения *S. demissum*, которые следует оберегать от переноса на них других штаммов.

Есть сведения, что УВК<sup>NTN</sup> преодолевает резистентность сортов картофеля к обычным штаммам вируса (Heuvel et al., 1994, цит. по: Фолимонова и др., 1998), поэтому очевидна необходимость скрининга сортов на устойчивость к данному заболеванию. Иммунохимические методы в данном случае неприемлемы, так как белки оболочки УВК<sup>NTN</sup> и родственных некротических штаммов полностью идентичны. Надежно позволяет диагностировать штамм УВК<sup>NTN</sup> и отличать его от других штаммов вируса, используя образцы неочищенного сока растений и клубней картофеля, метод иммуноспецифической обратной транскрипции и ПЦР (ИС-ПЦР) (Фолимонова и др., 1998). Метод ИС-ПЦР был основан, с одной стороны, на идентичности эпитопов УВК<sup>NTN</sup> и антигенном родстве некротических штаммов УВК (УВК<sup>N</sup>), а с другой – на отличии их геномных последовательностей. На первой стадии метода вирусные частицы связывались с адсорбированными на стенках пластиковых пробирок антителами, «узнающими» широкий спектр штаммов УВК. Далее на матрице вирусной РНК проводили реакцию синтеза первой цепи кДНК, которую затем использовали в ПЦР. Поскольку один из праймеров соответствовал 5'-концевому участку геномной РНК УВК<sup>NTN</sup>, отличающемуся по последовательности от генома УВК<sup>N</sup>, комбинация двух описанных праймеров в ПЦР вела к амплификации характерного фрагмента ДНК длиной 835 пар оснований (Weidemann, Maiss, 1996).

Таким образом, задача четкой диагностики штаммов УВК до сих пор остается актуальной, несмотря на то, что данной проблемой занимаются не одно десятилетие. Появление новых агрессивных штаммов затрудняет их диагностику, сдерживает работы по селекции перспективных сортов картофеля на устойчивость к УВК. Ниже мы приведем результаты наших исследований при использовании иммунодиагностиком для ИФА с целью изучения антигенной специфичности штаммов УВК.



**Антигенные свойства  $YBK^O$ ,  $YBK^N$  и  $YBK^C$   
из различных географических регионов**

При получении иммунодиагностикумов на основе ПАТ и МАТ важно учитывать такой фактор, как антигенная специфичность капсидных белков вирусов. Работами многих исследователей показано, что по этому признаку вирусы и их штаммы могут настолько различаться, что антисыворотка, приготовленная против одного из них, не реагирует с другими штаммами этого вируса. Эту особенность необходимо учитывать при диагностике  $YBK$ , так как в различных географических зонах России вирус представлен разнообразными группами штаммов. Отечественные исследователи антигенные свойства штаммов  $YBK$  изучали сравнительно мало (Гордейчук, 1967; Козар и др., 1977; Чеголина, Зейрук, 1978). В основном этими авторами были приготовлены антисыворотки к местным изолятам вируса, которые использовались для выявления вируса в полевых условиях капельной агглютинации. Однако многие штаммы  $YBK$  не удается выявить рутинными методами серодиагностики. Но и при использовании современных коммерческих диагностических наборов для ИФА нередко получают результаты сомнительного характера, недостаточные для уверенного обнаружения штаммов  $YBK$ . Возможно, диагностика затруднена из-за низкой концентрации вируса в растениях картофеля или различной степени антигенной специфичности серотипов вируса (поэтому антитела взаимодействуют избирательно). По нашему мнению, для приготовления надежных иммунодиагностикумов, необходимо иметь антисыворотку с набором антител, позволяющую выявлять серотипы  $YBK$  независимо от географической зоны выращивания картофеля. Такие антисыворотки можно получить, иммунизируя животных смесью очищенных препаратов серотипов  $YBK$  или смесью иммуноглобулинов, выделенных из антисывороток, приготовленных к различным серотипам. В идеальном варианте достаточно идентифицировать антигенно-активный штамм, несущий на своей поверхности эпитопы разных серотипов  $YBK$ , или получить такой же штамм либо общую для всех серотипов антигенную детерминанту химическим синтезом.

Нами были изучены антигенные свойства и определена антигенная специфичность изолятов, выявленных в различных регионах бывшего СССР и ряда европейских стран, для получения надежных иммунодиагностикумов. Исходным материалом  $YBK$  служили различные сорта картофеля, возделываемые в Республике Беларусь, Украине, Эстонии, Казахстане, Республике Саха, различных регионах России – Московской, Куйбышевской, Омской, Новосибирской, Ленинградской областях, Приморском крае. На присутствие  $YBK$  испытывали сорта картофеля: Омега, Финаль, Генетика, Ревену, Виоля, Волжанин, Лорх, Кинельская роза, Чаровница, Сорокодневный, Пала вараяне, Невская горка, Йыегавский желтый, Андо-8, Яакко, Филатовский, Приекульский ранний, Тулунский ранний, Пауль Вагнер, Самородок, Мурманский, Белорусский ранний, Неда, Белорусский гибрид и др.

Для идентификации  $YBK$  были привлечены все известные для этого вируса растения-индикаторы, реагирующие четкими симптомами: *N. tabacum* cvs. Samsun,

Xanthi, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *S. deimissum* (гибрид А-6), *Ph. floridana*, *G. globosa*, *D. stramonium*. В качестве контроля использовали штаммы УВК<sup>0</sup>, УВК<sup>N</sup>, УВК<sup>С</sup>, полученные из Голландии от J.A. de Vokx и любезно предоставленные нам Ж.В. Блоцкой, изоляты УВК<sup>N</sup> (сорта Невский и Приекульский ранний из Ленинградской области) от Л.П. Козлова и В.С. Обручкова, а также материал, предоставленный Ю.А. Варицевым из Всероссийского НИИ картофельного хозяйства – немецкие штаммы УВК<sup>N</sup> и УВК<sup>0</sup>, УВК<sup>N</sup> от de Vola и венгерский изолят УВК<sup>С</sup>.

Вирус накапливали в растениях *N. tabacum* cvs. Samsun и Xanthi. Очищенные препараты получали по методу В.К. Новикова с соавт. (1982). Для расщепления вирусного белка растительными протеазами в буферные растворы добавляли 0,1 М PMSF (Phenylmethyl sulfonylfluoride фирмы Serva). Листья гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,6–7,8, с добавлением 0,005 М ЭДТА и 0,2 %-ого 2-меркаптоэтанола. Осветление сока проводили доведением рН до 7,6–7,8, затем центрифугировали (12000 g × 20 мин) и добавляли тритон Х-100 до 1 % (инкубация 30 мин при 4 °С). Вирус осаждали 4–5 % ПЭГ (м.м. 6000), 0,3 М NaCl – 2 ч при 4 °С (центрифугирование 12000 g × 10 мин). Затем проводили дифференциальное центрифугирование (60000 g × 90 мин; 8000 g × 10 мин) или центрифугировали (60000 g × 2,5 ч) через сахарозную подушку (30 %-ная сахароза, 5 %-ный ПЭГ, 0,3 М NaCl). Экстракцию осадков проводили в 0,05 М боратном или 0,03 М глициновом буфере, рН 7,6–8,0.

Полученными препаратами иммунизировали кроликов по следующей схеме: 1-й день – 0,6–0,8 мг антигена с полным адьювантом Фрейнда (1:2) в/к и п/к в 5–8 точек по боковым линиям и вдоль позвоночника; 7, 14-й дни – 0,6–0,8 мг антигена с адьювантом в/м; 21-й день – 0,6–0,8 мг антигена в/в.

Титр антисывороток определяли КА, РДД и непрямой вариант ИФА, используя коммерческие конъюгаты – антимышьиные антитела кролика и антикроличьи антитела козы с пероксидазой из хрена, а также диагностические наборы ИФА для массового анализа на основе ПАТ, выпускаемые НИИ картофельного хозяйства (Московская область), МАТ к УВК<sup>N</sup> (клоны УЗС6, У4В1 и У20), полученные в институте химической и биологической физики АН Эстонии (г. Таллин), кроличьи ПАТ и иммунодиагностикумы для ИФА, приготовленные самостоятельно к дальневосточным изолятам УВК<sup>0</sup>, УВК<sup>N</sup> и европейскому УВК<sup>С</sup> (голландский материал). Иммуноглобулины (IgG) выделяли двукратным осаждением с применением сульфата аммония (25 % насыщения) и последующей хроматографией на ДЕАЕ – сефадексе А-50. Конъюгаты с пероксидазой из хрена с  $R_z = 2,4–2,6$  получали по методу японских исследователей (Nakane, Kawano, 1974). В работе были использованы следующие буферные растворы: 0,1 М NaHCO<sub>3</sub> с 0,15 М NaCl, рН 9,5 – для сорбции антигенов и антител; 0,15 М буфер хлорида Na и фосфата, рН 7,4, с 0,05 %-ным Твин-20 – для отмывки не связавшихся реагентов и конъюгатов. Для определения пероксидазной активности использовали субстрат: 0,05 % ортофенилендиамина в 0,05 М цитратнофосфатном буфере, рН 5,0, с 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Оптическую плотность продукта реакции определяли на фотометре «Multickann» (Finland) при длине волны 492 нм. Последовательность операций в сэндвич-методе и непрямом варианте ИФА описана (Сибирякова и др., 1987 а). По



схеме сэндвич-метода определяли оптимальные концентрации от 1 до 100 мкг/мл и разведения конъюгатов – 1:50...1:1000 (0,0125–0,25 мкг/мл по пероксидазе из хрена). В каждой полученной системе были исследованы антигенные взаимоотношения изолятов УВК из различных географических зон.

*Изоляты группы обычных штаммов УВК.* В полученном нами клубневом материале различных сортов картофеля из разных регионов по биологическим свойствам были идентифицированы изоляты, отнесенные нами к группе обычных штаммов УВК. В дальневосточных образцах – сортах картофеля Невский, Филатовский, Пауль Вагнер, Прикульский ранний – также присутствовал УВК<sup>0</sup>. Полевые наблюдения показали, что этот штамм на картофеле вызывал морщинистую и полосчатую мозаики. Сначала признаки поражения проявлялись в виде темно-коричневых штрихов и пятен на листьях среднего и нижнего яруса, затем распространялись на верхние листья. К концу вегетации растений картофеля почти все листья засыхали и повисали на стеблях (рис. 69). В последующих репродукциях наряду с полосчатой обнаруживалась и морщинистая мозаика, наблюдалось угнетение роста растений. На растениях табака сорта Самсун после инфицирования УВК<sup>0</sup> отмечали посветление жилок на 15–20-й день после инокуляции с последующим появлением симптомов крапчатости на листьях. Максимальная концентрация вируса отмечена была на 20–25-й день после инокуляции. Выход вируса при получении очищенного препарата УВК<sup>0</sup> составил 180 мг/кг для дальневосточного изолята, 163 мг/кг – московского и 166 мг/кг – голландского, что соответствует литературным данным (Новиков и др., 1982). По результатам РДД антисыворотка к УВК<sup>0</sup> имела титр 1:256, в непрямом методе ИФА – 1:30000.

*Изоляты некротической группы штаммов УВК.* Фитосанитарный мониторинг посадок картофеля показал, что на сортоучастках Приморского края отмечено присутствие УВК<sup>N</sup> у растений картофеля сортов Приморский-10, Прикульский ранний и Филатовский. При этом визуальная оценка степени заражения УВК<sup>N</sup> растений в поле мало что давала, так как симптомы заболевания на картофеле почти не проявлялись, а если и отмечались, то в виде слабой крапчатости, бугристости, волнистости листовых пластинок. Когда же вирусом из полевого материала картофеля были инфицированы растения табака сорта Ксанти, то на 10–12-й день уже наблюдался некроз жилок листа и стеблей, прекращение роста и через некоторое время гибель растения. Максимальная концентрация вируса отмечена на 15–20-й день после инокуляции. Выход УВК<sup>N</sup> составил 144 мг/кг растительной массы для дальневосточного изолята, 126 мг/кг – ленинградского, 220 мг/кг – голландского. Титр сывороток по результатам РДД для дальневосточного изолята был 1:128–1:512, ленинградского и голландского – 1:64–1:256, в непрямом методе ИФА – 1:25600, 1:12800 и 1:30000 соответственно.

*Изоляты группы штаммов УВК<sup>C</sup>.* При обследовании полевого материала в Приморском крае растений картофеля, пораженных УВК<sup>C</sup>, обнаружено не было. При инокулировании растений европейскими изолятами УВК<sup>C</sup> в лабораторных условиях на табаке сорта Самсун симптомы проявлялись на 15–20-й день в виде слабой мозаики и пятнистости. Вирус максимально накапливался на 20–25-й день после инокуляции.

Выход вируса для голландского  $YVK^C$  составил 130 мг/кг листьев. Титр полученной сыворотки в РДД – 1:64–1:128, в непрямом методе ИФА – 1:10000.

Полученные препараты трех групп штаммов  $YVK$  имели характерный нуклеопротеидный спектр с  $E_{min}$  при 245 нм,  $E_{max}$  при 260 нм, соотношение  $E_{260/280} = 1,2-1,25$ .

Для характеристики антигенной специфичности исследуемых штаммов были проведены перекрестные реакции со всеми полученными антисыворотками в непрямом методе ИФА. Исследования проводили со следующими штаммами  $YVK$ :  $YVK^O$  – московскими ( $YVK^O_M$  и  $YVK^O_{0-3M}$ ), белорусским ( $YVK^O_B$ ), Санкт-Петербургскими ( $YVK^O_{СП}$  и  $YVK^O_{03-СП}$ ), дальневосточным ( $YVK^O_{ДВ}$ ), голландским ( $YVK^O_G$ );  $YVK^N$  – белорусским ( $YVK^N_B$ ), московским ( $YVK^N_M$ ), Санкт-Петербургским ( $YVK^N_{СП}$ ), голландскими ( $YVK^N_G$  и  $YVK^N_{ВОЛА}$ ), немецкими ( $YVK^N_H$  и  $YVK^O_H$ );  $YVK^C$  – московским ( $YVK^C_M$ ), голландским ( $YVK^C_G$ ), венгерским ( $YVK^C_B$ ). Очищенные препараты использовали в концентрации 10 мкг/мл, сок зараженных растений – в разведении 1:200 (контроль – сок здорового растения, гетерологичный антиген – ВТМ) и антивидовой конъюгат (IgG осла против IgG кролика) – в разведении 1:200. Для каждого изолята вируса получены кривые титрования антисывороток к  $YVK^N_{ДВ}$  в непрямом методе ИФА. Характер кривых и наличие перекрестных реакций между исследуемыми изолятами свидетельствовали о наличии антигенного родства эпитопов КБ, относящихся к разным группам штаммов  $YVK$ .

Для каждой полученной антисыворотки были оптимизированы концентрации антител и конъюгатов в сэндвич-методе ИФА (рис. 70). Отрабатывались оптимальные разведения полученных пероксидазных конъюгатов, которые составили для  $YVK^O_{ДВ}$  –

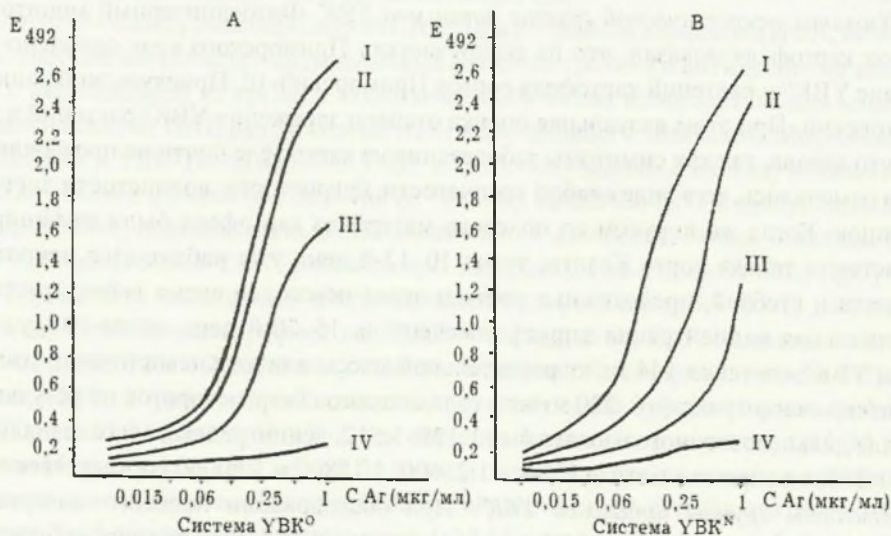


Рис. 70. Антигенные взаимоотношения между штаммами  $YVK^O$ ,  $YVK^N$ ,  $YVK^C$  в сэндвич-методе ИФА. А – система  $YVK^O$ : I –  $YVK^O$ , II –  $YVK^N$ , III –  $YVK^C$ ; В – система  $YVK^N$ : I –  $YVK^N$ , II –  $YVK^O$ , III –  $YVK^C$ ; IV – сок здорового растения



1:100,  $YVK^O_{O-3M}$  – 1:100,  $YVK^O_M$  – 1:100,  $YVK^O_R$  – 1:100,  $YVK^N_{СП}$  – 1:150,  $YVK^N_{ДВ}$  – 1:50. Экспериментально установлено, что оптимальная концентрация IgG в сэндвич-методе ИФА составила для изучаемых вирусов 5–10 мкг/мл. Минимальная концентрация вирусного антигена для всех штаммов, которую можно было выявить, составила 3–7 нг/мл. Эти данные согласуются с результатами А.Ф. Бобоковой с соавт. (1985): 10 нг/мл – для сэндвич-метода, 2 нг/мл – для непрямого метода и 130 нг/мл – для прямого варианта ИФА.

В результате постановки перекрестных реакций сэндвич-метода ИФА в системах  $YVK^O$ ,  $YVK^N$ ,  $YVK^C$  был получен ряд гомологичных и гетерологичных кривых и проведена количественная оценка антигенного родства исследуемых штаммов (табл. 41, 42). Начальная концентрация всех антигенов – 10 мкг/мл. Полученные результаты позволяют констатировать наличие антигенного родства между всеми тремя группами штаммов ( $YVK^O$ ,  $YVK^N$ ,  $YVK^C$ ). Однако можно отметить, что антитела, полученные к изолятам некротических и обычных штаммов  $YVK$ , слабо реагировали с двумя изолятами из группы  $YVK^C$  ( $YVK^C_M$ ,  $YVK^C_B$ ) и немецкими –  $YVK^O_H$ ,  $YVK^N_H$ .

Таблица 41

Концентрация изолятов  $YVK$ , выявленная сэндвич-методом ИФА в гомологичных и гетерологичных системах, нг/мл

Антиген (препарат вируса)	Система антител и конъюгатов к изолятам						
	$YVK^O_{ДВ}$	$YVK^O_M$	$YVK^O_{O-3M}$	$YVK^O_B$	$YVK^O_{ДВ}$	$YVK^O_{СП}$	$YVK^O_H$
$YVK^O_{ДВ}$	7	30	30	20	15	22	22
$YVK^O_B$	30	60	35	11	60	9	60
$YVK^O_{O-3M}$	7	15	7	9	15	7	15
$YVK^O_M$	15	30	15	15	120	9	30
$YVK^O_R$	60	120	9	17	60	9	120
$YVK^O_{ДВ}$	7	15	30	45	7	22	15
$YVK^N_{СП}$	15	15	22	30	22	9	60
$YVK^C_G$	60	60	30	30	30	9	15
$YVK^C_M$	120	60	45	40	120	120	30

По результатам сэндвич-варианта ИФА можно отметить более высокую антигенную специфичность изолятов  $YVK^N$  –  $YVK^N_M$ ,  $YVK^N_{ДВ}$ ,  $YVK^N_{СП}$ , а из группы обычных штаммов –  $YVK^O_{O-3M}$  и  $YVK^O_{ДВ}$ .  $YVK^C$  в гомологичных и гетерологичных системах реагировал слабее с антителами как к обычным, так и некротическим изолятам, что, вероятнее всего, связано с низкой авидностью антител.

Как видно из полученных данных,  $YVK^O$  и  $YVK^N$  являлись умеренными иммуногенами, а  $YVK^C$  отличался от них слабыми иммуногенными свойствами. Наиболее широкий спектр антигенной специфичности капсидных белков был характерен для штаммов группы  $YVK^N$ .

Антигенное родство изолятов УВК, выявленное сэндвич-вариантом ИФА

Система антител и конъюгатов	Изоляты УВК		
	*Сильное (0,75)	*Среднее (0,5–1,75)	*Слабое (0,5)
УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Волга</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub>	УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub>
УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>Г</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Волга</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub>	УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub>
УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>Г</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub>
УВК <sup>Н</sup> <sub>СП</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Волга</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>Г</sub>	УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub>
УВК <sup>Н</sup> <sub>В</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub>
УВК <sup>С</sup> <sub>Г</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Б</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>О</sup> <sub>Б</sub>	УВК <sup>Н</sup> <sub>В</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub>	

\*Отношение экстинкций ( $E^{492}$ ) гетерологичной и гомологичной реакции при концентрации вируса 1 мкг/мл.

Таким образом, в результате изучения изолятов УВК, полученных из различных географических регионов ближнего и дальнего зарубежья, по симптомам поражения картофеля и растений-индикаторов выделено три группы штаммов УВК – некротические, обычные и УВК<sup>С</sup>. Симптомы поражения УВК разнообразны и зависят от сорта картофеля и штамма вируса. Обычные штаммы вызывают на картофеле, как правило, более суровые симптомы, чем некротические. Для УВК<sup>Н</sup> характерны слабые мозаичные проявления на картофеле в поле, нередко этот штамм вируса вообще не вызывает видимых симптомов. Обычные и некротические штаммы УВК широко распространены во всех регионах России, где возделывается картофель. В процессе исследований отработаны методики получения очищенных препаратов штаммов УВК и моноштаммовых поликлональных антисывороток. Обычные и некротические штаммы УВК оказались умеренными иммуногенами, а УВК<sup>С</sup> проявлял слабые иммуногенные свойства. Полученные иммунодиагностикумы позволили выявить антигенно-активные изоляты УВК как среди некротических штаммов (УВК<sup>Н</sup><sub>М</sub>, УВК<sup>Н</sup><sub>л</sub>, УВК<sup>Н</sup><sub>ДВ</sub>), так и среди обычных (УВК<sup>О</sup><sub>М</sub>, УВК<sup>О</sup><sub>ДВ</sub>). На основе антисывороток, приготовленных к этим изолятам, были получены иммунодиагностикумы, пригодные для практической диагностики материала, зараженного УВК, независимо от штаммовой принадлежности. Высокая чувствительность разработанных сэндвич-вариантов ИФА позволила выявлять в растении до 3–7 нг/мл вируса. На территории России среди штаммов УВК наиболее распространен УВК<sup>О</sup>.



Таблица 42

ИФА
*Слабое (0,5)
УВК <sup>С</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub>
УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>М</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>М</sub>
УВК <sup>С</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub>
УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>Н</sub>
УВК <sup>Н</sup> <sub>Н</sub> , УВК <sup>Н</sup> <sub>ДВ</sub> , УВК <sup>С</sup> <sub>В</sub>

при концентрации

из различных  
штаммов поражения  
УВК – некротиче-  
зависят от сорта  
флоры, как правило,  
слабые мозаич-  
общее не вызывает  
распростране-  
исследований  
УВК и моноштам-  
штаммы УВК  
иммуногенные свой-  
антигенно-активные  
УВК<sup>Н</sup> дв), так и  
привлеченных к этим  
практической диа-  
принадлежности.  
позволила выяв-  
штаммов УВК наи-

Антигенная структура капсидных белков УВК<sup>Н</sup>

Известно, что именно в N-концевой части полипептидной цепи локализованы вирусспецифические эпитопы, тогда как родоспецифические сосредоточены в области трипсинустойчивого белка, свободного от N- и С-концов (Dougherty et al., 1985; Shukla et al., 1988). Локализация штаммоспецифического эпитопа наряду с вирус- и родоспецифичными, способными взаимодействовать с моно- и поликлональными антителами, имеет важное значение при исследовании топографии белка в капсиде, а выявление иммунодоминантной области в исследуемых капсидных белках потивирусов и определение ее структуры дает гарантию получения надежного иммунодиагностикума и открывает пути для создания синтетических пептидных антигенов в фитовирусологии.

Сравнение м.м. структурных белков УВК<sup>С</sup>, УВК<sup>Н</sup>, УВК<sup>С</sup> с помощью электрофореза в ПААГ показало, что в процессе получения очищенных препаратов штаммы УВК подвергаются частичному протеолизу. Помимо основной мажорной полосы белка с м.м. 32 кДа, соответствующей м.м. интактного капсидного белка, присутствуют несколько полос с более низкими значениями (рис. 71).

Электрофорез проводили в денатурирующих условиях на пластинах 12 %-ного ПААГ в системе Лэммли (Laemmli, 1970) при силе тока 30 мА в течение 4 ч. М.м. вирусных белков определяли из графика зависимости относительной электрофоретической подвижности от логорифма м.м. (Weber, Osborn, 1969). Для капсидных белков УВК<sup>С</sup> и УВК<sup>Н</sup> наблюдали сходство в расположении и количестве структурных белковых компонентов, в то время как белок УВК<sup>С</sup>, полученный солевым методом, подвергался сильному расщеплению на два полипептида. Эти данные указывали на гетерогенность структурных белковых компонентов штаммов вируса. Анализу подвергали вирусные белки штаммов, полученных солевым методом (Franki, McLean, 1968), когда к очищенному препарату вируса добавляли хлористый литий до концентрации 2 М и замораживали до -20 °С в течение 3 ч. РНК отделяли низкоскоростным центрифугированием. Полученный вирусный белок диализовали в воде до полного освобождения от солей. Было показано, что для УВК<sup>С</sup> характерна высокая степень лабильности белка, подвергающегося сильному расщеплению на два белка, что не присуще белку УВК<sup>Н</sup>. Эти данные о различном протеолизе вирусных белков штаммов УВК свидетельствуют о их различном строении. Основные структурные белки штаммов имели, согласно дан-

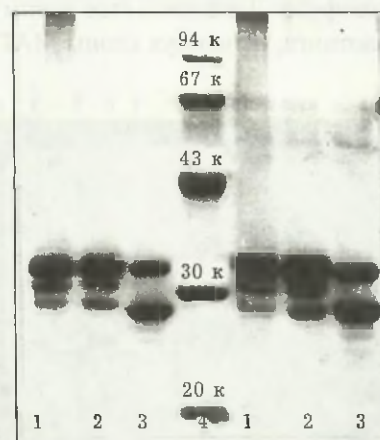


Рис. 71. Электрофореграмма капсидных белков штаммов УВК: 1 – УВК<sup>С</sup>, 2 – УВК<sup>Н</sup>, 3 – УВК<sup>С</sup>, 4 – белки-маркеры (сверху вниз): фосфорилаза (94 кДа), БСА (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоникангидраза (30 кДа), трипсин-ингибитор (20 кДа) (все препараты фирмы Serva)

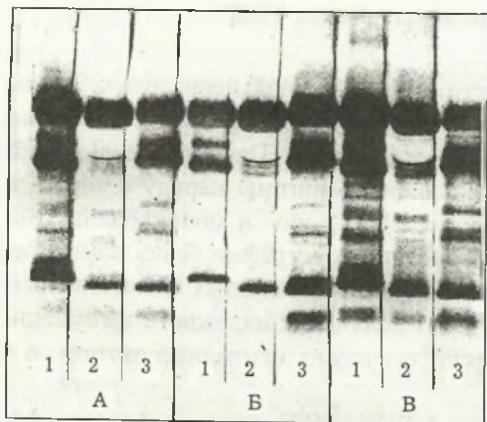


Рис. 72. Высокоактивная иммунодоминантная область, выявленная у штаммов YBK поликлональными антисыворотками иммуноблотингом: А – Ac YBK<sup>0</sup>, Б – Ac YBK<sup>N</sup>, В – Ac YBK<sup>C</sup>; препараты: 1 – YBK<sup>0</sup>, 2 – YBK<sup>N</sup>, 3 – YBK<sup>C</sup>

других потивирусов (Shukla, Ward, 1988). Эти авторы отмечают высокую степень гомологии (до 90 %) и большее сходство N-концевой области у штаммов одного потивируса. Доказательство своим предположениям мы получили с помощью иммуноблотинга, используя клоны МАТ Y3С6 и Y4В1. В данном эксперименте не отмечено

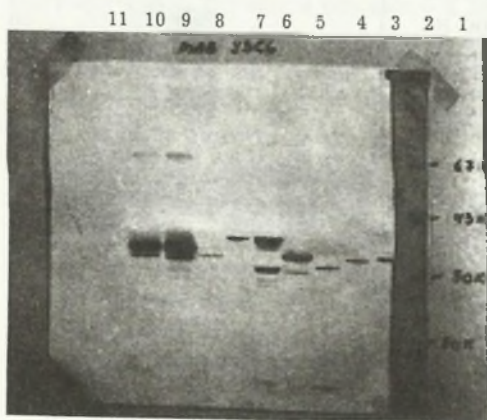


Рис. 73. Иммуноблотинг потивирусов с моноклоном Y3C6 YBK: 1 – ВЖМФ, 2 – ВЖКЛ, 3 – ВМГ, 4 – ВМС, 5 – ВМТ, 6 – ВТБ, 7 – АВК, 8 – YBK<sup>0</sup> (1:10), 9 – YBK<sup>0</sup> (1:20), 10 – сок здорового растения табака (1:10), 11 – сок здорового растения табака (1:20), справа – белки-маркеры

рым иммуноблотинга, высокую степень антигенного родства с поликлональными моноштаммовыми антисыворотками (рис. 72). Все белковые полосы YBK<sup>0</sup> и YBK<sup>C</sup> реагировали с антителами.

Что касается второй белковой полосы YBK<sup>N</sup>, то реакции не наблюдали, что, очевидно, указывало на отсутствие в данном белковом компоненте иммунодоминантных областей, которые во всех белках исследуемых штаммов выявлялись только в реакциях иммуноблотинга (м.м. 12–14 кД) и имели высокую степень антигенного родства со штаммоспецифическими антителами. Мы полагали, что эти пептиды содержат N- и C-концевые фрагменты со штаммоспецифическими эпитопами. Наши данные согласовывались с результатами, полученными для реакций с легкими пептидами. Это указывает о направленности используемых моноклональных антител на общие эпитопы коровой части – более устойчивой части капсидных белков штаммов YBK. Наши выводы нашли подтверждение в данных, полученных с помощью иммуноблотинга, который был поставлен с дальневосточными изолятами потивирусов и МАТ Y3С6 и Y20 (рис. 73). YBK, АВК, ВТМ, ВТБ, ВЖКЛ, ВЖМФ и ВМГ, присутствующие в соке тест-растений, реагировали в иммуноблотинге с моноклонами Y3С6 и Y20. Причем моноклон Y20 реагировал только с белком оболочки YBK<sup>N</sup>, тогда как Y3С6 – с капсидными белками всех потивирусов.

Антигенное родство дальневосточных изолятов потивирусов подтвержда-



ли также и результаты электрофореза. Вирусные белки присутствовали в растениях, зараженных этими вирусами (рис. 74).

Этот результат мы подтвердили двумя иммунохимическими методами: двойным антительным сэндвич-методом ИФА (ДАСМ) и непрямой метод ИФА. Моноклон Y3C6 реагировал со всеми исследуемыми потивирусами, тогда как МАТ Y20 только с YBK. Эти данные свидетельствовали в пользу того, что на поверхности капсидного белка YBK<sup>N</sup> локализован, по крайней мере, один эпитоп, общий для всей группы потивирусов. Ранее были получены моноклональные антитела к общим эпитопам YBK (Gugerli, Fries, 1979). В работе (Shukla et al., 1988) показано, что слабый трипсинолиз от частиц потивирусов отщепляет N- и C-концевые области и оставляет трипсинустойчивую часть белка оболочки с родоспецифичными эпитопами. С целью локализации поверхностных эпитопов YBK<sup>N</sup> нами с эстонскими коллегами вирусный препарат был подвергнут ограниченному протеолизу трипсином (Shukla et al., 1988). После высокоскоростного центрифугирования пептиды были разделены в обращенной фазе на колонке C18 (5 мМ, 4,6 × 260 мм, Zorbax ODS). Элюирование белков проводили в линейном градиенте (0–75 %) в течение 30 мин при скорости 1 мл/мин. Элюированные фракции собирали и высушивали. HPLC-фракции, содержащие триптические пептиды YBK<sup>N</sup>, подвергали автоматическому секвенсу (Applied BiosynteZ, Medel 470 A). Супернатант лиофилизовали и разделяли HPLC (рис. 75).

Полученные фракции были лиофилизованы и детектированы флуоресцентным анализом временного разрешения с применением монокло-

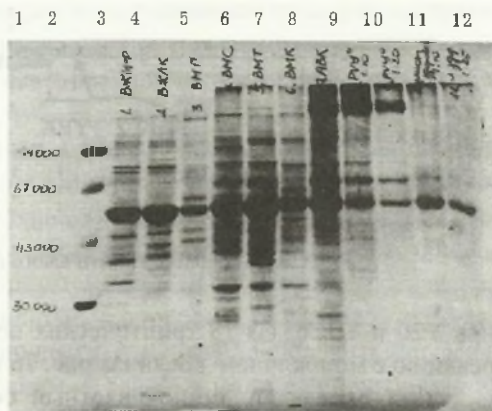


Рис. 74. Электрофореграмма белков дальневосточных изолятов потивирусов в ПААГ в присутствии ДСН: 1 – м.м. белков-маркеров, 2–12 – сок растений, инфицированных вирусами: 2 – ВЖМФ, 3 – ВЖКЛ, 4 – ВМГ, 5 – ВМС, 6 – ВМТ, 7 – ВТБ, 8 – АВК, 9–12 – YKB в разведениях 1:10, 1:20, 1:25

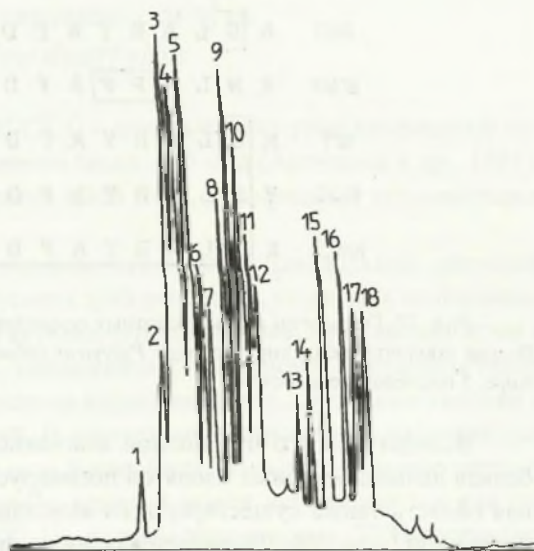


Рис. 75. Разделение триптических пептидов капсидного белка YBK<sup>N</sup> в обращенной фазе HPLC





нашей работе при постановке иммуноблотинга с использованием препаратов изучаемых потивирусов и поликлональной моноштаммовой антисыворотки к УВК<sup>N</sup> (дальневосточный штамм). Отмечена положительная реакция со всеми вирусами, хотя и разной степени интенсивности.

Итак, выявлена общая иммунодоминантная область капсидных белков потивирусов, соответствующая позиции полипептидной цепи 198–208 (Тир-Ала-Фен-Асп-Фен-Тир-Глу-Вал-Тре-Сер-Арг). УВК характеризуется разнообразием структуры различных штаммов и высокой способностью к образованию новых вариантов, причем наиболее подвержена этим изменениям группа штаммов УВК<sup>N</sup>. Внутри некротической группы постоянно происходят микроэволюционные процессы, результатом которых являются новые варианты штаммов, отличающиеся, как правило, большей вирулентностью, чем ранее известные. Возможно, одним из главных факторов, влияющих на образование новых штаммов, является селекция, направленная на получение новых устойчивых сортов картофеля. В связи с этим можно допустить, что при масштабном возделывании таких сортов происходит постепенное «приспособление» к ним вируса. Это приводит к образованию новых вариантов в результате мутаций, рекомбинаций при смешанной инфекции штаммов. Если новым вариантам все же не удастся вызвать патологический процесс у высокоустойчивых сортов, они могут быть опасны для средне- и слабовосприимчивых сортов картофеля, как это было в 70-е годы со штаммом УВК<sup>RVV</sup>, вызывавшим многочисленные эпифитотии в северо-западном регионе России (Kozlov et al., 2003).

#### Вирус желтой карликовости лука *Onion yellow dwarf virus*

Вирус желтой карликовости лука (ВЖКЛ) – длинные изогнутые нитевидные частицы размером  $770 \times 11$  нм. М.м. нативного белка – 35 кДа (Артюкова и др., 1988). Плавающая плотность в градиенте CsCl равна  $1,306 \text{ г/см}^3$ , коэффициент седиментации  $S_{20,w} - 143 \text{ S}$ .

Круг растений-хозяев ограничен несколькими видами однодольных растений родов *Allium*, *Muscari*, *Narcissus*. На растениях лука репчатого, выросших из пораженных вирусом луковиц, развивается желтая полосчатость листьев, приводящая затем к полному их пожелтению, скручиванию, уплощению и пониканию. Цветonoсы также желтеют, скручиваются и придают растениям карликовый вид. Цветочные головки и семена мельче, чем у здоровых растений. В клетках инфицированных растений выявляются цилиндрические включения в виде X-тел. Вирус вызывает сходную картину заболевания на нарциссе *Narcissus jonquilla*, который может использоваться для идентификации вируса (Билай и др. 1988). По данным этих авторов, ТТИ составляет  $58-60 \text{ }^\circ\text{C}$ , ПРС –  $10^{-4}$ , ПСИ –  $54-72 \text{ ч}$ .

Диагностические виды: *Al. ascalonicum* – на 28–30-е сут появляются хлоротическая мозаика, штриховатость, задержка роста; *Al. sepa* – на 30-е сут наблюдает-

ся хлоротичная штриховатость, деформация листьев; *Al. altaicum*, *Al. carinatum*, *Al. inconspicuum*, *Al. porrum* – реагируют на заражение хлоротичной штриховатостью; *Al. fistulosum*, *Al. ledebourianum* – наблюдается хлоротичная мозаика; *Al. sphaerocephalon* – на 36-е сут проявляется хлоротичная мозаика, штриховатость, деформация листьев, позже наблюдается задержка роста; *Al. triquetrum* – на 35-е сут на молодых листьях развивается белая штриховатость; *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor* – на 6–7-е сут появляются некротические пятна на инокулированных листьях.

В бывшей Югославии ВЖКЛ поражал посеvy лука *Al. sepa* и лука-шалота *Al. ascalonicum*, на некоторые полях отмечено более 50 % больных растений. Причиной заражения авторы считали легкий перенос вируса от больного растения к здоровому механически и с помощью тлей. Однако не отмечена передача вируса насекомыми на растения лука-порея *Al. porrum* (Stefanac, 1977).

Вирус в России отмечен во всех районах возделывания лука (Можаева, Васильева, 1972). Он поражает многие виды рода *Allium*, в том числе культивируемые повсеместно луки (репчатый, шалот) и чеснок (Вишниченко и др., 1990). ВЖКЛ влияет на товарный вид продукции, ведет к преждевременному прорастанию луковиц при хранении. Распространение вируса зависит от наличия источников инфекции. Существенный урон вирус наносит семеноводству, так как ВЖКЛ ведет к постепенному вырождению вегетативно размножаемых луковых растений.

ВЖКЛ передается механически и через посадочный материал. В нашей стране изучалась циркуляция ВЖКЛ. В качестве потенциальных резерваторов вируса анализировались семена, почва, однодольные и двудольные сорные растения, а в качестве векторов – эфифидный клещ и тли (Черемушкина, 1982). Оказалось, что вирус переносится многими видами тлей, питающимися на луке и других родственных видах растений, а также клешами *Aceria tulipae*. Замещающиеся луковицы больных растений инфекционны. Н.Д. Иорданова (1976) и Н.П. Черемушкина (1975, 1977) установили, что ВЖКЛ не передается семенами лука. Поэтому выращивание лука-шалота семенами можно рассматривать как один из главных резервов снижения пораженности растений.

Из института растениеводства и селекции СО РАСХН (г. Новосибирск) для идентификации возбудителя был получен вирусный материал лука-шалота 2 сортов – Сибирский желтый и Кустовка 513, а также здоровый материал для контроля. В период вегетации наблюдалось увеличение числа больных растений. Одновременно у растений лука-шалота наблюдалось снижение высоты растений (17–10 %), числа листьев (до 27 %), товарности (3–34 %), урожайности (23–64 %), содержания аскорбиновой кислоты (10 %) и сахаров (32 %) (Оржеховская, 1987). Эти больные растения лука-шалота были высажены в теплице. На больных растениях появились симптомы в виде штриховатости, хлоротичной мозаики, морщинистости. У явно больных растений перо увядало, надламывалось, полегло, верхушки усыхали, и многие из таких растений погибали прежде, чем успевали сформировать замешенные луковицы (рис. 78).

Основные меры борьбы – пространственная изоляция между весенними и перезимовавшими посевами лука, удаление растений с симптомами летом. Опыты, поставленные испанскими исследователями (Munoz, Dasamp, 1975), показали, что лук



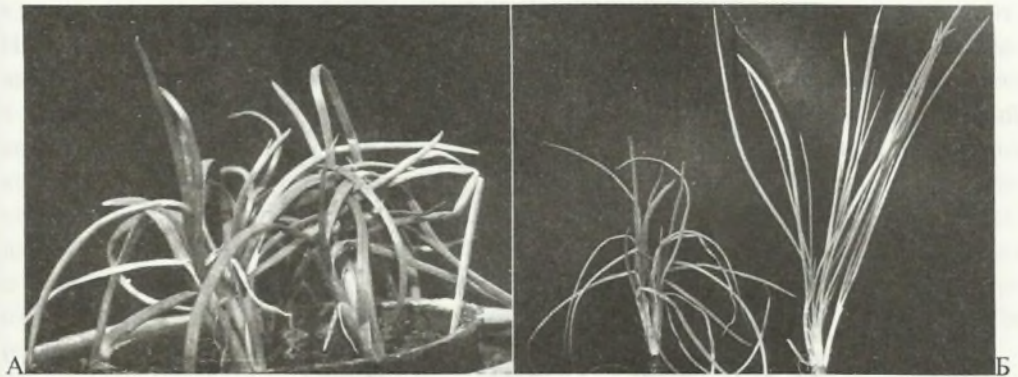


Рис. 78. Лук-шалот, зараженный вирусом желтой карликовости лука (А), контрольный – здоровое растение (Б)

от вирусной инфекции необходимо защищать на ранних стадиях развития растений. В качестве превентивных мер они рекомендовали использовать борьбу с переносчиками (тлями) и защитные полосы (лучше всего – злаковые культуры). Обработку растений фунгицидами эффективнее проводить до момента, когда лук достигнет половины периода своего развития.

При изучении круга растений-хозяев патогена были инокулированы растения 56 видов и сортов из семейств: *Alliaceae* J. Agardh., *Amaranthaceae* Juss., *Apiaceae* Lindl., *Asteraceae* Dum., *Chenopodiaceae* Vent., *Commelinaceae* R.Br., *Cucurbitaceae* Juss., *Solanaceae* Juss., *Liliaceae* Juss., *Iridaceae* Juss., *Fabaceae* Lindl., *Brassicaceae* Burnett., *Amaryllidaceae* Jaume. Симптомы поражения были отмечены на растениях 15 видов и сортов из рода *Allium* и 2 из рода *Chenopodium*. Растения 40 видов и сортов заразить вирусом не удалось, в том числе и 19 видов луков. Инокулированные листья *Ch. quinoa*, *Ch. amaranticolor* в ответ на заражение реагировали некротическими пятнами, которые уже были видны на 6-й день.

При просмотре в электронном микроскопе препаратов вируса, контрастированных 2%-ным уранилацетатом, pH 4,7–4,8, обнаружены нитевидные вирионы (рис. 79) длиной 700–720 нм. В эпидермальных клетках больных растений наблюдали в виде Х-тел вирусные включения.

В соке растений лука-шалота вирус сохранял инфекционность при комнатной температуре в течение 2 сут и инактивировался при температуре 65 °С.

Вирус легко передавался *M. persicae* с зараженного ВЖКЛ растения лука-шалота на здоровые. На 11-й день появлялись симптомы в виде хлоротичной штриховатости.

**Физико-химические свойства вируса.** Очищенный препарат ВЖКЛ мы получали, используя 2 методики. Одну применяли для вируса штриховатой мозаики чеснока (Mohamed, Young, 1984), другую – для очистки некоторых потивирусов (Новиков и др., 1984). Наша модифицированная методика заключалась в следующем: свежесор-

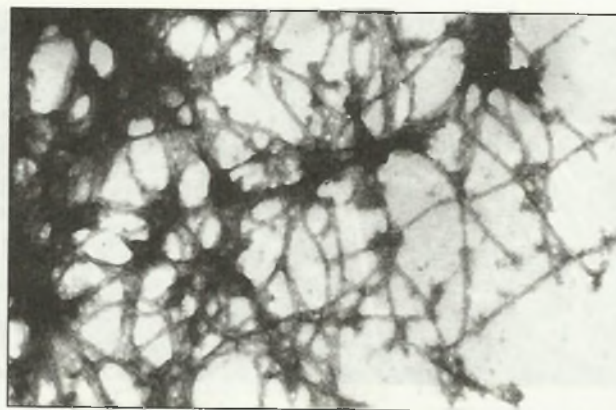


Рис. 79. Вирионы вируса желтой карликовости лука ( $\times 60000$ )

ванный материал (перо лука сорта Кустовка 513) замачивали на 3–5 мин в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,6–7,8, с 0,2 % 2-меркаптоэтанолом и 0,005 %-ным ЭДТА. После чего листья измельчали и гомогенизировали. Гомогенат отжимали через 2-слойную марлю и рН вирусосодержащей жидкости доводили до 7,6–7,8, а затем центрифугировали 20 мин при 8000 g. Осадки отбрасывали, к осветленным экстрактам прибавляли 1 %-ный тритон X-100, выдерживали смесь 30 мин, после чего к супернатанту добавляли 4 % ПЭГ и 0,3 М NaCl. Через 1–2 ч жидкость подвергали центрифугированию при 16000 g в течение 20 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадки подвергали 3–4-кратной экстракции в 0,05 М боратном буфере, рН 7,6 и центрифугированию (8–10000 g  $\times$  10–15 мин). Последнюю экстракцию проводили в 0,3 М глициновом буфере, рН 8,5. Все порции жидкости после экстрагирования собирали вместе, подвергали 2 циклам дифференциального центрифугирования (60000 g  $\times$  90 мин и 4000 g  $\times$  10 мин), осадок экстрагировали в 0,3 М глициновом буфере, рН 8,5.

Концентрацию вирусного препарата определяли спектрофотометрически, используя коэффициент экстинкции  $E_{260}^{0.1\%} = 2,4$ . Наличие вирусных частиц в получаемых в процессе очистки фракциях контролировали с помощью электронного микроскопа. Препарат вируса характеризовался типичным спектром поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 260 и минимумом при 245 нм. Соотношение величин оптических плотностей при 260 и 280 нм = 1,3. Выход вируса – 50 мг на 100 г листьев.

Сок растений рода *Allium* отличался очень высоким содержанием слизи, что затрудняло получение из него препарата вируса и приводило к его потерям. Однако, как оказалась, слизь легко агрегировалась при центрифугировании и осаждении ПЭГ (обычных приемах очистки вирусов растений).

По данным Е.В. Артюковой с соавт. (1990), в градиентах плотности цезия вирус седиментировал одной из видимых зон, где вирус часто агрегировал в крупные хлопья, которые затем плохо растворялись. Вероятнее всего, ультрацентрифугирование в



хлористом цезии для получения очищенных препаратов ВЖКЛ использовать не стоит. На значение плавучей плотности влияло и хранение препарата более 7 дней. Так, выявлялось два пика с плавучими плотностями:  $1,305 + 0,006 \text{ г/см}^3$  (среднее значение из 5 опытов) и  $1,328 + 0,010 \text{ г/см}^3$  (среднее из 9 экспериментов). Электрофоретический анализ, проведенный вышеупомянутыми авторами, выявил гетерогенность белкового компонента ВЖКЛ. Продукты ограниченного протеолиза папаином электрофоретически гомогенного капсидного белка ВЖКЛ и более низкомолекулярных полипептидов были идентичны по электрофоретической подвижности, что свидетельствовало о сходстве их аминокислотных последовательностей. М.м. капсидного белка сибирского изолята ВЖКЛ и 3 продуктов его деградации составили 35,1; 31,0; 30,2; 28 кДа (среднее из 7–10 определений).

Антисыворотки к выделенному препарату были получены по следующей схеме: 1-й день – 0,5 мг вируса внутрикожно, 8-й день – 1 мг внутримышечно, 15-й день – 0,4 мг внутривенно. В качестве иммуностимулятора использовали адъювант Фрейнда (Difco, USA). Взятие крови проводили на 5, 7, 11 и 18-й дни после последней иммунизации. Титр антисывороток определяли ориентировочно в КА, а за истинный титр принимали тот конечный результат РДД, когда еще наблюдали взаимодействие ВЖКЛ со специфическими антителами, контролем служила Ас неиммунизированного животного (рис. 80).

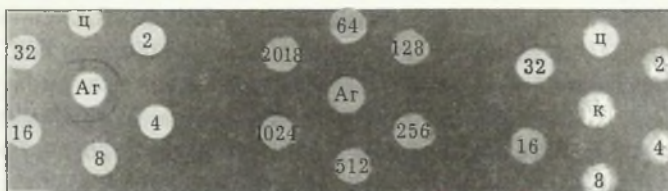


Рис. 80. Титр специфических антител к вирусу желтой карликовости лука по результатам РДД. В центральных лунках – препарат ВЖКЛ, в периферических – разведение специфической Ас; справа – контроль

В РДД использовали 1 %-ный агар (Bacto Agar, Difco, USA). Полосы преципитации проявлялись ярче, если в агар добавляли 1,5 % ПЭГ. В качестве антигена в КА использовали не зеленый сок пера лука, который из-за вязкости и непрозрачности не позволял визуально наблюдать взаимодействие антител с гомологичным вирусом, а сок из лукович, дающих прозрачную, слабой консистенции жидкость. Антигены в РДД перед внесением в лунки обрабатывали в течение 5–10 мин ультразвуком частотой 18 кГц (MSE 150 Watt Ultrasonic disintegrator МК-2) при 4 °С. Антисыворотка имела титры специфических антител: по результатам КА – 1:16384; РДД – 1:256; ИФА (непрямой вариант) – 1:16400–1:12800.

Для постановки сэндвич-метода ИФА антигены наносили в диапазоне концентраций 0,01 нг/мл – 100 мкг/мл, разведение конъюгата – 1:200, а сока пера и лукович зараженных растений –  $10^{-1}$ – $10^{-6}$ . В качестве субстрата использовали водный

раствор 5-аминосалициловой кислоты (0,8 мг/мл) с перекисью водорода (0,015 М). Контрольными являлись реакции с гетерологичным препаратом ВТМ. В результате постановки реакции сэндвич-метода ИФА были получены калибровочные кривые титрования препарата и сока. Высокая чувствительность метода позволила выявлять до 2–5 нг/мл вируса в препаратах и в соке зараженных растений при разведении порядка  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ . Определена концентрация ВЖКЛ в соке пера лука – 1,4–1,5 мг/мл и в соке луковиц – 0,87–0,92 мг/мл.

Для иммунодиагностики ВЖКЛ в очищенных препаратах и свежем соке больных растений лука применялся высокочувствительный метод ИЭМ. Сок зараженных растений и препараты ВЖКЛ (1 мг/мл) после оптимального разведения наносили на формваровые сеточки и декорировали специфической антисывороткой (разведение 1:50), затем контрастировали уранилацетатом. В результате наблюдали 100 % покрытие вирионов антителами гомологичной сыворотки плотным и равномерным слоем. Близкое антигенное родство вируса отмечено с ВЖМФ, частичное – с АВК и УВК, ВМС, ВМТ и ВТБ, что свидетельствовало о принадлежности вируса к роду *Potyvirus*.

По литературным данным, у ВЖКЛ есть родственный потивирус желтой полосатости лука-порея (ВЖПЛП) *Leek yellow stripe virus*. Они схожи во многом, например по симптомам на некоторых диагностических видах растений. Оба вируса длительное время сохраняют инфекционность в выжатом соке, имеют сходство вирусных частиц по морфологии (длина вирионов ВЖПЛП – 820 нм, ВЖКЛ – 833 нм), поражают лук *Al. cepa*, *Al. ascalonicus* и лук-порей *Al. porrum*. Однако ВЖПЛП в отличие от ВЖКЛ не заражает *Al. fistulosum* и вызывает местные поражения у *Ch. quinoa* и *Ch. amaranticolor*. Несколько отличаются у этих вирусов и внутриклеточные включения. Плавающая плотность в градиенте CsCl у ВЖПЛП – 1,326, а у ВЖКЛ – 1,306 г/см<sup>3</sup>. М.м. капсидного белка – 34 кДа у ВЖПЛП и 30 кДа у ВЖКЛ. Оба вируса имеют отдаленное антигенное родство. ВЖПЛП не передается через семена, но передается непersistентным способом тлей *M. persicae* (Bos et al., 1978). Эпидемии ВЖПЛП имеют место в конце лета и осенью. Источники вирусной инфекции располагаются вблизи посевов лука-порея (Bos et al., 1978). Если сравнить эти данные со свойствами изученного нами сибирского изолята ВЖКЛ, то не вызывает сомнения, что нами идентифицирован ВЖКЛ, который отнесен к роду *Potyvirus*. Полученная специфическая поликлональная антисыворотка позволяла диагностировать вирус не только в посевах лука в Новосибирской области, но в образцах различных сортов лука, полученных нами для выявления патогена из Иркутской области, и в растениях лука, выращиваемого в Приморском крае.

### Вирус мозаики сои *Soybean mosaic virus*

Вирус мозаики сои (ВМС) впервые описан М. Гаднером и Дж. Кендриком (Gardner, Kendrick, 1921) и представляет собой гибкие нитевидные частицы размером 650–750 × 15–18 нм (рис. 81).



Структурный белок вируса имеет два белковых компонента с м.м. 28,1 кДа (первый) и 32,6 кДа (второй). Коэффициент седиментации  $S_{20,w}$  – 141 и 147 S соответственно в 0,1 и 0,05 М боратных буферных растворах, pH 8, 0. В градиенте плотности CsCl вирус имеет 2 зоны – 1,26 и 1,25 г/см<sup>3</sup> (Пинкевич, Крылов, 1977). М.м. РНК – 3,02 мДа (Hill, Benner, 1980).

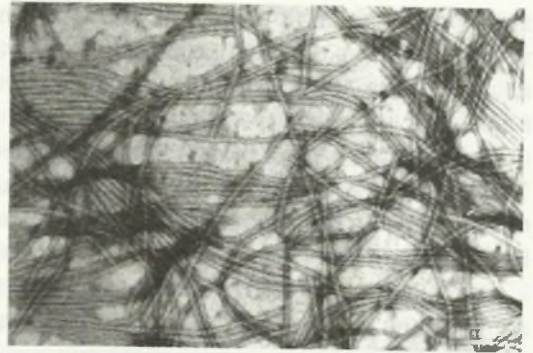


Рис. 81. Электронная микрофотография вирионов вируса мозаики сои

Круг растений-хозяев довольно узкий, в природе вирус отмечен практически только на сое, т.е. соя – естественный хозяин и единственное надежное растение, четко реагирующее на заражение вирусом. Есть данные, что на инокулированных листьях мари белой и рисовой могут появляться местные некрозы, но не все штаммы вируса способны вызывать такую реакцию (Билай и др., 1988). Симптомы, вызываемые вирусом на сое, подробно описаны еще в 1921 г. (Gardner, Kendrick, 1921). Это мозаика листьев, сопровождаемая их деформацией и пузыревидными вздутиями, посветление жилок, скручивание первичных листьев с последующим появлением морщинистости, пузырчатости, гофрированности пластинки листа. Волоски на бобах опадают, они становятся гладкими и блестящими. В зависимости от сорта зараженные семена иногда пигментированы. Бобы желтозерных сортов сои, собранные с больных растений, обычно имеют пеструю пигментацию. Долгое время считалось, что вирус поражает только сою *Glycine max* (большая часть растений различных сортов реагирует системной мозаикой). В настоящее время известно, что вирус может заражать свыше 30 видов растений (на 10 из них после инокуляции ВМС появляется только местная реакция) или вызывать у них латентную инфекцию. На мари квиноа *Ch. quinoa* развиваются слабые и диффузные хлоротичные локальные поражения, а на мари белой *Ch. album* – локальные поражения. Это единственные не бобовые растения-хозяева вируса. К диагностическим видам можно отнести также *French bean cvs. Pinto 111* и *Top Crop* – реагирует на вирус темными некрозами на 5–7-е сут, *Ph. lathyroides* – системной хлоротичной крапчатостью или мозаикой, скручиванием листьев, *Ph. vulgaris* – некротическими локальными поражениями на развивающихся инокулированных примордиальных листочках.

На Дальнем Востоке – основном регионе по выращиванию сои в России – ВМС впервые выявлен в 1966 г. (Поливанова, 1969). Вирус вызывал у растений сои мозаику, морщинистость, пузырчатость, гофрированность, деформацию листовой пластинки, а также четкое посветление жилок листа. Проведенные автором обследования посевов сои в Приморском и Хабаровском краях, в Амурской области показали, что этот вирус является одним из самых распространенных и вредоносных на сое.

Болезнь, вызываемая вирусом у сои, особенно опасна при раннем заражении растений. ВМС легко передается инокуляцией сока, из поколения в поколение пере-

дача осуществляется семенами. Семенная передача для ВМС – обычный источник передачи вируса. Однако замечено, что растения, инфицированные после цветения, не дают зараженных семян. Вирус присутствует в семенной оболочке и в зародыше, незрелые семена содержат больше вируса, чем вызревшие. Показано, что процент передачи вируса через семена – сортовой признак и составляет 6–25 % (Поливанова, 1969). Основные переносчики вируса в агроценозах – разнообразные виды тлей *Aphis fabae*, *M. persicae* (16 видов), которые переносят вирус непersistентным способом. Вирус распространен повсеместно, где возделывается соя.

В цитоплазме клеток восприимчивых к вирусу растений образуются Х-тела, в которых при электронной микроскопии в ультратонких срезах выявляются типичные цилиндрические включения, характерные для потивирусов.

Вирус не только снижает урожай на 15–70 %, но и влияет на качество семян. В зависимости от сорта и степени проявления болезни наблюдается снижение содержания белка в зерне на 7–12 %, массы – на 25 %, ухудшается товарный вид зерна в результате пигментации (Поливанова и др., 1980).

По данным этого же автора и других исследователей (Ахатова, 1974; Onki, Inoue, 1998), ТТИ – 55–62 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 3–4 сут. Наиболее стабилен вирус при pH 6,0–8,0.

В результате фитосанитарного мониторинга посевов сои в Амурской области на базе Всероссийского НИИ сои (г. Благовещенск) и в Приморском крае (коллекционные питомники) были выделены изоляты, вызывающие у растений сои хлоротическую пятнистость и хлороз жилок листа. При изучении их биологических свойств выявлены различия. Так, оба амурских изолята ВМС передавались тлей, но ТТИ была у них разной: у одного – 55 °С, а у другого – 75 °С, при этом семенная передача у них была невысокая – 6,9 % и 3,7 % соответственно. Различались изоляты и по кругу растений-хозяев.

Из пяти приморских изолятов только у трех отмечена передача тлей, семенная передача – у четырех (но в разной степени – от 1,8 до 30 %). Различались они также по ТТИ, по симптомам, вызываемым на специфических для вируса тест-растениях – *G. hispida*, *Ph. vulgaris*, *P. sativum* и др., что свидетельствовало о видовом разнообразии ВМС.

В Японии в результате инокуляции ВМС 102 сортов сои описаны две большие группы штаммов: обычные, вызывающие типичные симптомы для вируса – скручивание листьев и мозаичный узор листовой пластинки, и более патогенные штаммы, присутствие которых в растениях сои у большинства сортов вызывало симптомы задержки роста, скручивание листьев, желтую пигментацию, раннее увядание и отмирание (Такахаси и др., 1969). В зависимости от степени патогенности первая группа была разделена на штаммы – А, В и С, а вторая – на D и E. Все штаммы ВМС реагировали с антисыворотками к ВМС и ВЖМФ. Штамм В вируса являлся, по мнению этих авторов, типичным штаммом ВМС и самым распространенным в мире.

Изучался штаммовый состав ВМС, поражающего культивируемые сорта сои, и в ДВ регионе России (Поливанова, 1980). Выявленные автором изоляты вируса прове-



рялись на сортах-дифференциаторах, при помощи которых идентифицированы были штаммы вируса в Японии (Такахаси и др., 1969). По характеру вызываемых симптомов и патогенности дальневосточные штаммы ВМС были разделены на три большие группы: сильно-, слабо- и среднепатогенные. Слабый штамм ВМС обнаружен был на посевах сои в Амурской области. Он вызывал незначительную морщинистость и волнистость краев листьев, иногда слабую мозаичность. На Дальнем Востоке наиболее распространен среднепатогенный штамм, им было поражено большинство сортов сои. Его обнаружили в Хабаровском, Приморском краях и в Амурской области. Этот штамм вызывал морщинистость, гофрированность и мозаичность листьев сои. По своим свойствам он был близок к штамму В вируса, описанному в Японии (Ейу-Куоо, Goodman, 1974; Hunsht, Tolin, 1982). Сильный штамм ВМС вызывал пожелтение и некротизацию листьев и верхушек растений сои. Нередко последние погибали или не образовывали бобов.

Отрабатывая методику накопления и препаративного выделения ВМС, для сравнения использовали в качестве исходного материала свежесорванные листья растений сои, инокулированные вирусом, и клетки каллуса. Эти исследования проводились с целью достижения как можно более высокой степени очистки ВМС и для получения более концентрированного вирусного препарата. Хорошо известно, что в процессе очистки для вируса характерна сильно выраженная тенденция к агрегации и фрагментации, а главное, вирус накапливается в сое в очень низкой концентрации.

Вирус для выделения накапливали в растениях сои сорта Приморская-494, максимальная его концентрация отмечалась на 40–45-й день. Для получения очищенного препарата использовали методику японских исследователей (Hitachi, Wakimoto, 1985) и немецких (Lesemann et al., 1979). Оказалось, что обе методики были равноценны. По первой методике экстракцию вируса проводили в 0,3 М натрий фосфатном буфере, рН 7,0, с 0,01 М диэтилдитиокарбоматом натрия (ДИЕКА). Для осветления гомогената применяли хлороформ и бутанол до 8 %, осаждение вируса проводили 6 %-ным ПЭГ (м.м. 6000). Осадки суспендировали в 0,05 М натрий фосфатном буфере, рН 7,0, с добавлением 0,05 М ЭДТА. Для устранения агрегации частиц каждый этап выделения сопровождался ультразвуковой обработкой препарата вируса в течение 10–15 сек при частоте 12 кГц. Дальнейшая очистка – дифференциальное и зональное центрифугирование в градиенте сахарозы (20–50 %).

По второй методике гомогенизацию материала проводили в 0,5 М боратном буфере, рН 7,8 с 0,2 %-ной аскорбиновой кислотой и 0,2 %-ным  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и с добавлением  $\text{AgNO}_3$  (0,4 %-ный водный раствор). Смесь инкубировали в течение ночи и осветляли хлороформом. Осадки суспендировали в 0,05 М боратном буфере, рН 7,8, содержащем 0,5 М мочевины и 0,1 % 2-меркаптоэтанола. Дальнейшая очистка, как и в первом случае – дифференциальное и зональное центрифугирование.

Полученные препараты имели типичный спектр поглощения нуклеопротеида в УФ-области с минимумом 245 нм и максимумом 260 нм. Соотношение  $A_{260/280}$  – 0,96–1,07. Максимальный выход вируса для типичного штамма ВМС – 4–16 мг/кг инфицированного материала. Для других штаммов ВМС обычно выделялось не

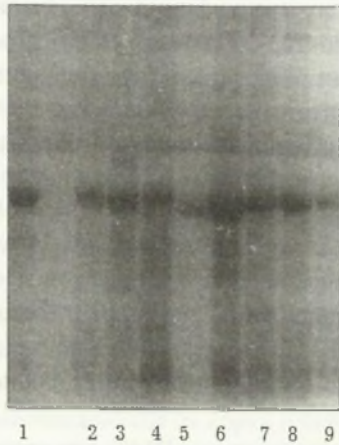


Рис. 82. Электрофореграмма капсидных белков изолятов ВМС. 1 – типичный штамм ВМС, 2–9 – изоляты ВМС: 1–2 – амурские, 3–9 – приморские, 5 – белок-маркер (карбоникангидраза, м.м. 30 кДа)

более 1–3 мг вируса на 1 кг инфекционного материала. Так, выход амурских изолятов ВМС был 0,94–0,79 мг/кг, приморских – 1,9; 1,3; 0,79; 0,5; 1,06 и 1,02 мг/кг. Электрофоретически не отмечено различий в капсидных белках семи амурских и приморских изолятов вируса. Выявлен основной белковый компонент с м.м. 32 кДа и 1–2 полосы с м.м. 30–28 кДа как результат протеолиза основного белка под действием растительных протеаз (рис. 82). Электрофорез проведен с осветленным низкоскоростным центрифугированием инфекционным соком растений сои, зараженных ВМС.

При использовании электрофореза в ПААГ в очищенных вирусных препаратах обнаруживались 2 белковые зоны с м.м. 28 и 32 кДа. Если же брали каллусную массу, то выделенный из нее вирусный препарат имел 1 белковый компонент. Кроме того, из каллуса легче было проводить очистку вируса, так как в нем отсутствовал зеленый пигмент. Однако выход вируса из каллуса был ниже, чем из

сока свежесорванных листьев. Применение стероидных гликозидов устраняло этот недостаток и повышало содержание вируса в каллусе (Кинтя и др., 1987; Балашова и др., 1985). Максимальные сроки накопления вируса в каллусе – 35–45 дней (Какарека, 1995).

Антисыворотки были получены по используемой нами схеме иммунизации для потивирусов. Вирус – средний иммуноген. Полученные антисыворотки имели титры: по результатам РДД – 1:32–1:64, КА – 1:64–1:256 и в непрямом варианте ИФА – 1:3000. Подбор оптимальных условий для ИФА показал, что концентрация иммуноглобулинов в сэндвич-методе составляет 5–10 мкг/мл с использованием  $F(ab')_2$ -фрагментов при первичной сенсibilизации – 5 мкг/мл, а концентрация иммуноглобулинов 10 мкг/мл.

Традиционным сэндвич-методом ИФА удалось выявить 1–3 нг/мл вируса в соке зараженных растений при его разведении 1:15000. При использовании  $F(ab')_2$ -фрагментов – 8–15 нг/мл, в соке – 1:1000.

По результатам РДД было выявлено антигенное родство между ВМС, ВЖМФ и УВК (рис. 83), а с помощью ИЭМ – показан самый высокий процент идентичных эпитопов у ВМС с ВМГ, более низкий – с АВК и УВК, ВМТ, ВЖМФ, ВЖКЛ и ВТБ.

Обобщая наши результаты, можно сказать, что основная трудность при изучении дальневосточных изолятов ВМС заключалась, во-первых, в низкой концентрации вируса в листьях инфицированных растений сои, из 1 кг листьев в результате наших экспериментов выход вируса составил 1–14 мг. Вторая трудность была связана с наличием в листьях сои сопутствующих вирусной инфекции белков, зеленых и бурых пигментов, липидов и т.д., которые влияли на чистоту вирусного препарата. Из трех

Рис. 83. Капсиды – Ag в ВЖМФ и ВЖКЛ – периферия А

основных генные – антигенным. Soybean tobacco

Впервые А. Блакестон Вирус имеет Америка. Впервые это другим исслед. относящихся Результаты ровки табака Центральной вирусы табачный вирус встречается паслене черной

С. Душанне томатах с селами табачной

На юге распространения ВГТ имел зараженных растений вирус заражен С. Душанне –



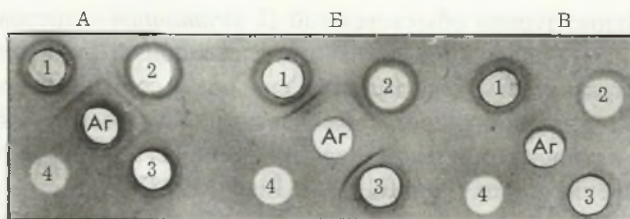


Рис. 83. Выявление родоспецифических эпитопов у потивирусов РДД. В центральных лунках – Ag к ВЖМФ (1 мг/мл), обработанный 0,1 % твин-80 (А), 0,1 % ДСН (Б), ультразвуком (В); по периферии – Ас: 1 – ВЖМФ, 2 – ВМС, 3 – УВК, 4 – цельная нормальная Ас (контроль)

основных групп дальневосточных штаммов ВМС (сильно-, слабо- и среднепатогенные – типичные) последние были самыми распространенные в ДФО. По своим антигенным, биологическим и физико-химическим свойствам они являются видом *Soybean mosaic virus* рода *Potyvirus*.

### Вирус гравировки табака *Tobacco etch virus*

Впервые заболевание, вызываемое вирусом гравировки табака (ВГТ), описано А. Блакесли в 1921 г. (цит. по: Purcifull, 1981) на растениях дурмана (*Datura spp.*). Вирус имеет очень широкое географическое распространение: Восточная и Южная Америка, Канада, Китай, Мексика, Венесуэла, Индонезия и США (Liang, 1998). Впервые это заболевание было выявлено на табаке в 1930 г. (Johnson, 1930). Позже другим исследователем было показано, что большое количество видов растений, относящихся к различным семействам, заражаются этим вирусом (Holms, 1946). Результаты исследования в середине прошлого столетия показали, что вирус гравировки табака (ВГТ) являлся более распространенным на растениях перца, например, в Центральной Флориде, чем даже такие вредоносные и широко распространенные, как вирусы табачной и огуречной мозаики или УВК (Anderson, 1959). Но наиболее часто вирус встречался, по данным этого автора, на льнянке канадской *Linaria canadensis* и паслене черном *Solanum nigrum* – резерваторах ВГТ для культурных растений.

С. Дулиттл и Л. Андерсон (Doolittle, Anderson, 1959) выявили ВГТ в теплицах на томатах с сильными некрозами на листьях, причем в смешанной инфекции с вирусами табачной и огуречной мозаики.

На юге европейской части России И. Худына (1941) показал, что ВГТ довольно распространен на плантациях табака, при этом если в начале вегетационного периода ВГТ имел незначительное распространение, то во второй половине лета число зараженных растений возрастало с 12 до 72 %. Показано, что в естественных условиях вирус заражал многие растения, вызывая различные симптомы: перец однолетний *C. annuum* – карликовость растения, крапчатость и деформация листьев, уменьше-

ние размеров плодов; дурман обыкновенный *D. stramonium* – листовая крапчатость, окаймление жилок и уродливость листа; томат съедобный *Lycopersicon esculentum* Mill. – листовая крапчатость, деформация и сильное уменьшение урожайности; физалис *Physalis* sp. – листовая хлороз; табак настоящий *N. tabacum* – крапчатость, мозаика, кольцевая пятнистость и некротическая гравировка; картофель *S. tuberosum* – мозаичное окаймление жилок (Purcifull, 1981; Liang, 1998).

Насекомыми – переносчиками ВГТ являются более 10 видов тлей, но наиболее активной среди них является тля *M. persicae*. Семенами пораженных растений вирус не передается (Purcifull, 1981).

ВГТ имеет довольно обширный круг экспериментально поражаемых растений, входящих в семейства: *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*. М. Клинковский считал, что круг растений, поражаемых механически этим вирусом, может быть представлен более 150 видами (Klinkowski, 1977).

Физические свойства вируса зависят от изолята. Так, изолят вируса, выделенный в Китае из картофеля, являлся неустойчивым и имел ТТИ 55–57 °С, ПСИ – 6 ч. ПРС –  $10^{-2}$ , а изолят, выявленный на табаке в Индонезии, был более стабильным, имея ТТИ – 60–65 °С, ПСИ – 5–8 сут, ПРС –  $10^{-5}$  (Liang, 1998).

При обследовании овощных культур в коллекционном питомнике ДВ опытной станции ВИР было обнаружено растение перца с симптомами слабой кольцевой пятнистости. В препаратах, полученных из этого растения методом погружения, в электронном микроскопе обнаружены нитевидные частицы длиной около 750 нм, что соответствует литературным данным, полученным для вирусов рода *Potyvirus* (Hollings, Bruhl, 1981). У 15 растений *N. tabacum* cv. Xanthi, на которые были помещены тли *M. persicae*, питавшиеся на зараженном перце, через 8 дней появлялись симптомы вирусного поражения. Поэтому данные о морфологии вирионов, способности переноса инфекции тлей позволили предположить, что изучаемый вирусный изолят следует считать одним из видов рода *Potyvirus*.

Для изучения круга поражаемых растений-хозяев вирусом инокулировали растения 40 видов и сортов из семейств: *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Commelinaceae*, *Solanaceae*, *Violaceae* (табл. 43).

Таблица 43

Реакция тест-растений на заражение вирусом гравировки табака

Тест-растения	Симптомы поражения
<i>Allium saxatile</i> L.	—*
<i>Amaranthus caudatus</i> L.	—
<i>Am. paniculatus</i> L., cv. Sanquiheus	—
<i>Am. tricolor</i> L.	—
<i>Atropa belladonna</i> L.	S: RM
<i>Capsicum annum</i> L.	L: NR, S: RM

Celosia
Chenopodium
Ch. album
Ch. ambrosioides
Ch. murale
Ch. quinquefolium
Commelinaceae
Datura stramonium
Cucumis
Водолей
Декан
Дальневосточный
Дальневосточный
Феникс
Cucurbitaceae
Glycine
Gomphrena
Hyoscyamus
Lycopersicon
Невский
Хабаровский
N. glutinosum
N. occidentale
N. rustica
N. tabacum
Samsun
N. sylvestre
N. sanderi
N. paniculatum
Ocimum basilicum
Petunia
Phaseolus
Physalis
Solanum
Viola tricolor
Vigna striata

\* Растения не поражаются

Восприимчивы  
Из них у 6 выявлены  
rale, Ch. quinoc



Тест-растения	Симптомы поражения
<i>Celostia argentea</i> L.	—
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	L: N
<i>Ch. album</i> L.	—
<i>Ch. ambrosoides</i> L.	L: N
<i>Ch. murale</i> L.	L: N
<i>Ch. quinoa</i> Willd.	L: N
<i>Commelina benghalensis</i> L.	—
<i>Datura stramonium</i> L.	L: CISp, S: RSP
<i>Cucumis sativus</i> L., сорта:	
Водолей	—
Декан	—
Дальневосточный-6	—
Дальневосточный-27	—
Феникс	—
<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>pattison</i>	—
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	—
<i>Gomphrena globosa</i> L.	—
<i>Hyoscyamus niger</i> L.	L: CISp, S: RSp
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., сорта:	
Невский	S: CIVe
Хабаровский	—
<i>N. glutinosa</i> L.	S: CIM, RM
<i>N. occidentalis</i> L.	L: NRM
<i>N. rustica</i> L.	S: RM, NR
<i>N. tabacum</i> L., cvs.: Xanthi	L: NR, S: CIM, N, NVe, BdVe
Samsun	S: RM
<i>N. sylvestris</i> Speg et Comes	L: NR, S: CIMot, CIVe
<i>N. sandera</i> Wats	L: CISp, S: BdVe
<i>N. paniculata</i> L.	—
<i>Ocimum basilicum</i> L.	—
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	S: CIM, CIMot, Sp, RM
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	—
<i>Physalis alkekengii</i> L.	—
<i>Solanum dulcamara</i> L.	L: N
<i>Viola tricolor</i> L.	S: CIM, VC
<i>Vigna sinensis</i> (Hassk.) Endl.	—

\* Растение не заражалось

Восприимчивыми к заражению изолятом оказались растения 19 видов и сортов. Из них у 6 выявлены симптомы только локального характера: *Ch. amaranticolor*, *Ch. murale*, *Ch. quinoa*, *Ch. ambrosoides* из семейства *Chenopodiaceae* и *Solanum dulcamara*,



Рис. 84. Лист *N. tabacum* L. cv. Samsun с системной кольцевой мозаикой после заражения вирусом гравировки табака

*N. occidentalis* из семейства *Solanaceae*. Остальные чувствительные к вирусу растения с системной или локальной реакцией (кроме *Viola tricolor*) являлись представителями семейства *Solanaceae*. Характерной особенностью для большинства поражаемых вирусом тест-растений были очень специфические симптомы: дубовидный хлоротичный узор вдоль главной и средней жилок, рисунок как бы выгравирован на листе, позже этот узор некротизировался (рис. 84). На перце однолетнем *S. animum* кроме локальных некротических колец и системной кольцевой мозаики вирус вызывал сильное уменьшение размеров плодов.

Были определены физические свойства вирионов. При температуре 60–65 °С изучаемый вирус инактивировался в соке пораженного растения. При выстаивании такого сока при комнатной температуре инфекционность вируса сохранялась в течение 2 сут, а предельное разведение сока составляло  $10^{-2}$ , что указывало на низкую концентрацию вируса в растении. Реакция вируса с антисывороткой, специфичной к ВОМ, по результатам РДД была отрицательной, что указывало на моноинфекцию.

Очищенные препараты ВГТ получали по методу В.К. Новикова с соавт. (1984). Они имели нуклеопротеидный спектр с локальным максимумом при 260 нм, что характерно для вирусов рода *Potyvirus*. Выход вируса – 15–20 мг/100 г инфекционного материала,  $A_{260/280} = 1,2$ . Очищенные препараты ВГТ, хранившиеся при + 4 °С и при – 12 °С с добавлением глицерина и тимола, были инфекционны в течение 3-х мес.

Таким образом, литературные и полученные нами данные по симптоматике и экспериментальному кругу поражаемых растений-хозяев, физическим показателям вирионов, возможности передачи вируса тлями *M. persicae*, морфологии вирусных частиц, а также по физико-химическим характеристикам вируса позволяют считать, что вирус, выделенный из перца с симптомами слабой кольцевой пятнистости на листьях, является вирусом гравировки табака *Tobacco etch virus* рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*.

Для получения специфической антисыворотки иммунизацию кроликов проводили с недельным интервалом в/к и трижды в/м с адьювантом Фрейнда. Дозы иммуногена – 1,0 мг; 1,5 мг; 1,75 мг; 2,5 мг.

При постановке РДД с целью определения титра полученной поликлональной антисыворотки и определения антигенного родства эпитопов капсидного белка ВГТ с другими вирусами рода *Potyvirus* обязательным условием для получения положительных реакций ВГТ со специфическими антителами было разрушение длинных нитей вириона на фрагменты. Использовали несколько способов: ультразвук, нагревание

на водяной бане  
ной суспензией  
Пришлось при  
ДСН. Титр ан  
препарат вирус  
1:2048. В РДД  
ципитации, ест  
ВЖМФ, УВК,  
ВАМК, который

Рис. 85. Опы  
ки РДД). А, Б: в  
гомологичной Ас  
ростного центриф

Была опре  
другими вирус  
анализ антиген  
имеет с УВК, ч  
между антисыв  
ки арбуза 1 (к  
вирусов и ВГТ  
сон (рис. 86).

Дальневост  
личался от изо  
особенностью в  
тений, которые  
по изучению и



на водяной бане вируса до 45 °С, попеременное замораживание и оттаивание вирусной суспензии. Однако физическое воздействие не дало положительного результата. Пришлось применить химический фактор для разрушения вируса, используя 1 %-ный ДСН. Титр антисыворотки к ВГТ был равен 1:2048, если антигеном служил чистый препарат вируса (рис. 85). По результатам КА антисыворотка к ВГТ также имела титр 1:2048. В РДД иммунный комплекс Ат + Аг был представлен четкими линиями преципитации, если в качестве антигена выступали другие вирусы рода *Potyvirus* – ВМА, ВЖМФ, УВК, ВМС, но антисыворотка не реагировала с потексвирусами – ХВК, ВАМК, которые использовались в качестве контроля.

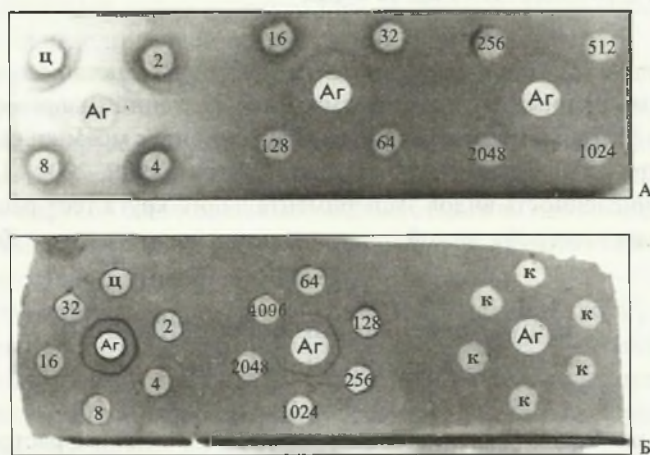


Рис. 85. Определение титра специфических антител к ВГТ (А, Б – разные варианты постановки РДД). А, Б: в центральных лунках – чистый препарат ВГТ (1 мг/мл), по периферии – разведение гомологичной Ас, Б (справа) – контроль: по периферии – сок здорового растения после низкоскоростного центрифугирования, в центре – Ас против ВГТ

Была определена степень антигенного родства между изучаемым вирусом и другими вирусами рода *Potyvirus*, имеющимися в нашей коллекции. Сравнительный анализ антигенных взаимоотношений показал, что наиболее близкое родство ВГТ имеет с УВК, что согласуется с литературными данными (Purcifull, 1981). Реакция между антисывороткой к ВГТ и ВЖМФ (изоляты из тыквы и фасоли), вируса мозаики арбуза 1 (изолят из тыквы) указывала на более отдаленное родство данных потивирусов и ВГТ. Наименьшее родство было выявлено между ВГТ и вирусом мозаики сои (рис. 86).

Дальневосточный изолят ВГТ по биологическим свойствам незначительно отличался от изолятов вируса, описанных в литературе. Тем не менее отличительной особенностью нашего изолята был узкий круг экспериментально поражаемых растений, которые относились в основном к семейству *Solanaceae*. Наши исследования по изучению индивидуальных свойств дальневосточных изолятов вирусов из родов





виде посветления мелких жилок, а на более поздних стадиях – мозаичный рисунок. На растении зебрина висячая *Zebrina pendula Schnizl.* вначале обесцвечивались мелкие жилки листа, затем симптомы болезни маскировались и растение выглядело внешне здоровым. На растениях традесканции белоцветковой на 14-й день после инокуляции соком больного растения появлялась хлоротичная мозаика, типичная для естественно инфицированных растений. Один из видов растений – *Commelina filifolia* K. Schum. поражался бессимптомно. Тинантия недолговечная является лучшим тест-растением для размножения и выделения вируса. Несколько уступала ей традесканция белоцветковая. В литературе подобный вирусный изолят описан как штамм вируса мозаики коммелины (Lochart et al., 1981).

Вирус передавался непersistентно тлей *M. persicae*. Нами установлено, что семенами тинантии недолговечной не происходит передача вируса.

В соке зараженных растений тинантии вирус утрачивал инфекционные свойства при прогревании от 50 °С до 55 °С и хранении в комнатных условиях от 1 до 2 сут.

В отличие от вируса мозаики коммелины и вируса традесканции ВТБ хотя и заражал растения традесканции белоцветковой и зебрины висячей, но все же имел отличные от этих вирусов симптомы. Необходимо отметить, что к числу устойчивых к вирусу оказалось растение роео двухцветная, которая является одним из растений-хозяев вируса мозаики коммелины (Hollings, Brunt, 1981).

Для получения очищенного препарата ВТБ его размножали в растениях тинантии недолговечной или традесканции белоцветковой. В период максимального накопления вируса на 15–24-й день листья с ярко выраженными симптомами гомогенизировали в 0,5 М калийно-фосфатном буфере, рН 7,6, содержащем 0,005 М ЭДТА и 0,2 % 2-меркаптоэтанола. Экстракт осветляли хлороформом (12,5 %) и бутанолом (8 %). Повторное осветление проводили 1 %-ным тритоном X-100.

Вирус концентрировали дважды: 4 %-ным и 8 %-ным ПЭГ в присутствии 0,1 М NaCl. Дальнейшую очистку проводили двумя циклами дифференциального центрифугирования (30000 g × 90 мин и 10000 g × 10 мин) или ультрацентрифугированием через слой 30 %-го раствора сахарозы. В качестве ресуспенсирующего буфера брали 0,05 М боратный буфер, рН 7,5, содержащий азид натрия. Максимальный выход вируса составил 12–15 мг на 100 г листьев традесканции белоцветковой и до 30 мг – тинантии недолговечной. Препараты ВТБ обладали специфическим нуклеопротеидным спектром поглощения в УФ области с соотношением  $A_{260/280} = 1,35$ ; соотношение максимального и минимального поглощения – 1,13.

Электрофоретический анализ белкового компонента вирионов показал, что в свежечищенных препаратах ВТБ содержится обычно один полипептид с м.м. 34 кДа. При хранении препарата вируса происходило отщепление небольшого полипептида и появлялся белок с м.м. 32 кДа. К концу 4-й нед хранения образовывался еще один белок с м.м. 29 кДа. Через 5 нед хранения от основного белкового компонента отщеплялось еще 4–5 более легких полипептидов (рис. 88).

Ранее за рубежом из растений коммелины диффузной были идентифицированы 2 вируса, отличающиеся по симптомам на растениях-хозяевах, форме цитоплазматиче-

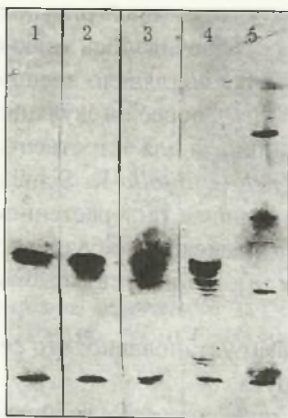


Рис. 88. Электрофореграмма капсидного белка вируса традесканции белоцветковой. 1 – свежечищенный препарат; 2 – через неделю хранения; 3 – после трех недель хранения; 4 – после пяти; 5 – белки-маркеры

ческих включений и антигенным свойствам (Morales, Lettler, 1977; Migliori, Lastra, 1978). В растениях традесканции белоцветковой Б. Локхардом с соавтр. (Lochart et al., 1981) был выявлен другой потивирус. Физико-химические свойства изучали А. Миглиори и Р. Ластра (Migliori, Lastra, 1980) и установили, что м.м. капсидного белка вируса коммелины диффузной 34 кДа, а плавающая плотность  $1,33 \text{ г/см}^3$ . В наших исследованиях структурный белок ВТБ оказался нестабильным и деградировал под действием растительных протеаз, что не отмечалось авторами для вируса, выявленного из растений коммелины диффузной, поэтому наш изолят вируса мы не можем отнести к нему.

Для получения кроличьей антисыворотки животных иммунизировали трижды с недельным интервалом. За одну иммунизацию 500 мкг вируса вводили внутривенно и внутримышечно с адьювантом Фрейнда. Третья иммунизация была внутривенной.

Максимальный титр специфических антител в реакции КА – 1:2048–1:4096, в РДД – 1:32–1:16, ИФА (непрямой вариант) – 1:64000. Наши результаты согласовывались с литературными данными. Так, В. Локхарт с соавт. (Lochart et al., 1981) тоже получили антисыворотку с титром в РДД 1:16. Эти авторы для получения полос преципитации в РДД вирусный антиген обрабатывали ДСН, в нашем случае вирус подвергался действию ультразвука в течение 15–20 мин при частотах 15–18 кГц.

В иммунохимических реакциях РИЭФ, ИФА и ИЭМ было отмечено антигенное родство ВТБ с АВК, УВК, ВМС, ВМТ, ВЖМФ и ВЖКЛ.

Мы не располагали антисывороткой к вирусам мозаики коммелины и мозаики традесканции белоцветковой, полученной зарубежными исследователями, поэтому нам не удалось с вероятностью установить, являлся ли идентифицированный нами вирус традесканции белоцветковой самостоятельным видом рода потивирусов или это штамм одного из двух указанных вирусов. Трудность заключается еще и в том, что очень слабо изучены биологические, физико-химические и антигенные свойства этих вирусов зарубежными коллегами. Ясно одно – данные по идентификации дальневосточного изолята вируса традесканции белоцветковой позволяют включить его в род *Potyvirus*.

### Вирус мозаики клевера гибридного *Trifolium hybridum* mosaic virus

При обследовании клеверов в Приморском крае было выявлено заболевание клевера гибридного *Trifolium hybridum* L. (Костин, 2005). Симптомы болезни про-



являлись в виде мозаики, окаймления жилок, иногда кольцевой пятнистости. Круг растений-хозяев вируса включал растения 33 видов, преимущественно из семейства бобовых *Fabaceae*. Вирус мозаики клевера гибридного (ВМКГ) поражал 17 видов растений из семейств *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Polygonaceae* Juss., передавался механически и тлями неперсистентно. Вирус не передавался через семена инфицированных растений гороха, бобов, фасоли, маша, вигны. ТТИ – 55–60 °С, ПСИ – 2 сут в соке бобов, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-3}$ . Морфометрия вирионов показала, что модальные размеры ВМКГ при pH 4,5 составляли  $780+6 \times 12+1$  нм, при pH 7,5 –  $825+8 \times 13+1$  нм (Волков и др., 1989).

Как все потивирусы, ВМКГ сильно агрегировал в процессе выделения, что значительно снижало его выход. Методика, включающая использование в качестве экстрагирующего раствора 0,1 М глициновый буфер и 0,2 % 2-меркаптоэтанола (pH 7,0), осветление хлороформом и бутанолом (8 %), короткое время осаждения ПЭГ в концентрации 6 % и обработку ультразвуком при 12 кГц в течение 5 сек после каждого низкоскоростного центрифугирования, позволила получить высокоочищенные препараты с типичным нуклеопротеидным спектром; соотношение  $A_{260/280}$  составило 1,2. Средний выход вируса после очистки – 3 мг на 100 г свежесорванных листьев. Следует отметить, что концентрация ВМКГ в растениях варьировалась в зависимости от времени года. Так, при благоприятных условиях в теплице (умеренная температура, длинный световой день в апреле–мае) выход вируса составлял 10–12 мг на 100 г листового материала. Электронной микроскопией в препаратах ВМКГ выявлены длинные нитевидные частицы, характеризующиеся значительной степенью агрегации. При контрастировании 2 %-ным уранилацетатом и просмотра с увеличением в 30000 раз в вирионах наблюдалась поперечная исчерченность, характерная для вирусов рода *Potyvirus* (Hamilton, Edwardson, 1981).

Электрофоретический анализ белкового компонента ВМКГ показал, что в препаратах содержится один полипептид м.м. 35,1 кДа. Сравнительное пептидное картирование с двумя другими потивирусами – ВТБ и ВМТ – показало, что м.м. белка оболочки ВТБ составляла 37 кДа (Артюкова и др., 1988), а у ВМТ выявили 2 полипептида с м.м. 38 и 32 кДа (Моисеенко и др., 1991). Ограниченный протеолиз проводили папаином, который обладал специфичностью в отношении аргинина, лизина и глицина. При сравнении гидролизатов белков ВМКГ и ВМТ были обнаружены 8–10 общих полипептидов. Наличие пептидов, идентичных по электрофоретической подвижности, вероятно, свидетельствовало о сходстве аминокислотных последовательностей этих вирусов. По количеству общих пептидов белок ВМКГ структурно оказался близок белку ВМТ. Электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле РНК ВМКГ выявлен один компонент, характерный для потивирусов, с м.м. 3,3 мДа (рис. 89).

Антисыворотка, приготовленная к ВМКГ, была специфична и не реагировала с соком здоровых растений бобов в РДД. Титр антисыворотки – 1:32. Вирус является умеренным иммуногеном.

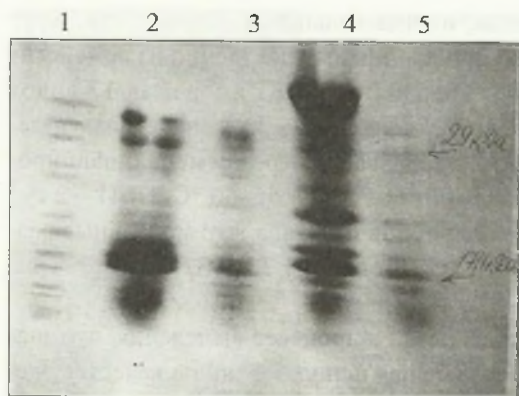


Рис. 89. Частичный протеолиз белков трех дальневосточных изолятов потивирусов. 1 – ВМКГ (м.м. 31,5 кДа); 2 – ВТБ (м.м. 34,0 кДа); 3 – ВТБ (м.м. 32,0 кДа); 4 – ВМТ (м.м. 38,0 кДа); 5 – ВМТ (м.м. 32,0 кДа)

мозаики клевера горного), по всей вероятности, можно считать новым видом рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*.

### Вирус пестролепестности тюльпана *Tulip breaking virus*

Вирионы вируса пестролепестности тюльпана (ВМТю) – нитевидные, размером 750–760 × 14–16 нм (Навалинскене-Макутенайте, 1981).

Круг растений-хозяев узкий и ограничен в основном растениями из семейств лилейных (*Tulipa* sp., *Lilium* sp.). Вирус строго специализирован, и характер проявления симптомов зависит от стадии развития растения. Вирус вызывает пестролепестность тюльпана и болезни некоторых сортов лилий. Симптомы вируса наиболее ярко проявляются на цветках: около середины – неправильные полосы. На многих сортах тюльпана они преобращают тонкий перистый рисунок по краям лепестков и полосатость по их центральной части. На некоторых сортах тюльпанов кроме пестролепестности появляется крапчатость или полосатость листьев, которая иногда не очень отчетлива, кроме того, наблюдается отставание в росте, в сроках цветения. У отдельных сортов перистый рисунок образуется в местах исчезновения основной окраски, и цветок приобретает белую или желтую окраску, у других – основная окраска сгущается, и на цветке проявляются штрихи и полосы. Последний тип симптомов отмечен у темно-красных сортов. Тип самой пестролепестности и ее интенсивность зависят от сорта тюльпанов и от стадии развития зараженного растения. Если заражение происходит в начале вегетации, то пестролепестность бывает интенсивной, а

Подбор оптимальных условий для проведения непрямого метода ИФА показал, что для первичной сорбции антигена концентрация вируса должна быть 5 мкг/мл, а разведение антивидового конъюгата 1:1000. Титр антисыворотки в непрямом варианте ИФА – 1:6400–1:128000. Высокая чувствительность метода позволила достоверно выявить 1–3 нг/мл ВМКГ в очищенном препарате и соке инфицированных бобов в разведении  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ . Обнаружена высокая степень антигенного родства капсидных белков ВМКГ и ВЖМФ.

На основании полученных данных вирус мозаики клевера гибридного (первоначальное название – вирус



после образования бутонов или во время цветения – неярко выраженной, иногда симптомы проявлялись только на следующий год. Установлено, что сорта тюльпанов с белыми, желтыми и красными цветками часто скрыто несут в себе вирус и являются источником вирусной инфекции для здоровых растений (Макутенайте-Навалинскене, 1981). Раньше типичные симптомы поражения – появление штрихов и полос на фоне основной окраски цветка – считали сортовым признаком, который отмечали еще в 1555 г. (цит. по: Рыжков, 1946). Тем не менее вирусная природа этого заболевания была установлена только в 30-е годы прошлого столетия (Cauley, 1928, цит. по: S. Phillips, 1996). В качестве индикаторного растения использовали лилии *Lilium formosanum* и тюльпаны *Tulipa hybrids*, механически инфекция передалась через 2 нед после инокуляции. На других сортах лилии развивалось системное поражение – мозаика, пятнистость, деформация листьев (Билай и др., 1988). Вирус заражает *Amaranthus retroflexus*, *A. triplex hortensis*, *Ch. amaranticolor*, *Ch. murale*, *Crotalaria spectabilis*, *Cucumis sativus*, *D. stramonium*, *Glycine max*, *G. globosa*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *Petunia hybrida*, *Phaseolus vulgaris*, шпинат новозеландский *Tetragonia expansa*, *Tirenia fournieri*, *Vicia faba*, *Vigna unguicelata*, *Zinnia elegans*. Вирус не заражает нарцисс *Narcissus pseudonarcis*, гиацинт восточный *Hyacinthus orientalis* и гиппеаструм гибридный *Hippeastrum hybridum*.

В клетках эпидермиса пораженных вирусом растений вблизи ядра были обнаружены крупнозернистые околядерные включения (Шатрова, 1970).

ТТИ – 65–70 °С, ПРС – 10<sup>-5</sup>, ПСИ – 2–6 сут (Phillips, 1996).

ВПТю считается сильным иммуногеном и имеет антигенное родство со многими потивирусами – наибольшее с вирусом гравировки табака, среднее с ВЖМФ, вирусом мозаики гиппеаструма, АВК, УВК и др.

Вирус передается тлями, механическим путем и сохраняется в луковицах. Зараженные растения тюльпанов являются постоянными носителями вируса, который передается потомству через луковицы, и в итоге сорта тюльпанов постепенно вырождаются (Власов, 1992).

ВПТю имеет распространение во всех странах, где выращиваются тюльпаны, и поражает от 20 до 80 % растений (Макутенайте-Навалинскене, 1981).

Вирус обнаружен в Приморском крае на растениях тюльпанов сорта Деметра (цит. по: А.В. Крылов, 1992). Наиболее четко симптомы проявлялись на цветках, но у некоторых сортов тюльпанов – на листьях в виде слабой штриховатости и крапчатости.

### Вирус мозаики турнепса

#### *Turnip mosaic virus*

Частицы вируса мозаики турнепса (ВМТ) имеют длину 720–780 нм. Плавающая плотность в CsCl – 1,335 г/см<sup>3</sup>. РНК составляет 5 % общей массы вируса. Определена последовательность 1800 нт. в 3'-концевой части геномной РНК. В секвенированной последовательности идентифицирована одна длинная непрерывная ОРС, 5'-конец

которой находится за пределами секвенированного участка. Определена последовательность аминокислот в трех участках молекулы белка оболочки вируса, включая N-конец этого белка. Показано методом секвенирования, что 3'-конец РНК ВМТ кодирует белок оболочки. Последовательность аминокислот в БО вируса близка к последовательности белков оболочки других секвенированных потивирусов. Длина не-транслируемой 3'-концевой области РНК составляет 667 п.н. (Tremblay et al., 1990). В последние годы проведена сравнительная характеристика в структуре геномов популяций вируса в Западной и Восточной Евразии (Spak et al., 2004).

Вирус распространен повсеместно на культурных и дикорастущих растениях различных семейств. Из культурных растений чаще всего системно поражает растения семейства капустных (различные виды капусты, турнепс, хрен, горчицу и многие др.) (Толкач и др., 1991). На турнепсе первоначально начинается пожелтение жилок, а потом появляется желтая крапчатость на молодых листьях. Затем листья скручиваются и уменьшаются в размерах, растения отстают в росте. Позднее на листьях развивается мозаичная расцветка и курчавость.

В качестве тест-растений могут быть использованы мари – амарантоцветная *Ch. amaranticolor*, квиноа *Ch. quinoa* и мурале *Ch. murale* (хлоротические местные некрозы); капусты кочанные *Brassica oleraceae* var. *Capitata* и *Br. campestris* (на 7-е сут после инокуляции обесцвечиваются жилки листьев, на 14-е сут начинается деформация вновь отрастающих листьев и на них проявляется хлоротический рисунок); *N. glutinosa* (коричневые некрозы, образующиеся на 7–11-е сут), гомфрена шаровидная (темно-зеленые округлые местные поражения, позже краснеющие), *Br. cauliflora* (латентная инфекция) (Tomlinson, 1970).

Уже к началу 60-х годов прошлого столетия было описано большое количество штаммов и изолятов вируса. Только в Японии в разных регионах страны было отобрано 120 изолятов вируса. Для того чтобы как-то систематизировать их, японский исследователь Х. Яоши (Yoshii, 1963) выделил две группы штаммов вируса, различающихся по реакции растений капусты кочанной *Brassica oleraceae* var. *Capitata* и табака клейкого *N. glutinosa*. Первая группа получила название капустных штаммов ВМТ (cabbage strains), они продуцировали суровые некротические пятна на капусте кочанной и суровую мозаику на табаке клейком. Вторая группа штаммов ВМТ была названа обычными штаммами (ordinary strains), они вызывали на тест-растениях слабые симптомы вирусного поражения системного характера или вообще не вызывали симптомов. Пока разделение изолятов ВМТ на эти две группы штаммов сохраняется до сих пор.

У растений брюквы, инфицированной ВМТ, облиственность растений уменьшалась на 55 %, масса корнеплодов на 63 %, а у редьки масса корнеплода снижалась от 3,3 до 100 % в зависимости от времени заражения, а потеря массы семян составляла 95,8 %. Эти семена слабо прорастали (Ahlawat, Chenula, 1982).

Вирус легко передается механически и переносится непersistентным способом многочисленными видами тлей (поэтому возможна эпифитотия). Передача через семена пока неизвестна.

ТТИ – 55–60 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 2–4 сут.



В цитоплазме клеток, инфицированных вирусом, образуются Х-тела в виде цилиндрических включений, характерных для потивирусов.

Вирус – неплохой иммуноген (Choi et al., 1978).

В Приморском крае изолят ВМТ обнаружен на производственных посевах лобы. Вирусом инокулировали растения 60 видов и сортов, относящихся к 5 семействам. Его удалось передать на растения 23-х видов и сортов (табл. 44). Системно патоген

Таблица 44

Реакция растений на заражение обычным штаммом вируса мозаики турнепса (дальневосточный изолят)

Семейство, вид и сорт растений	Симптомы поражения
<b>Amaranthaceae</b> <i>Amaranthus caudatus</i> <i>Gomphrena globosa</i>	L: NSp L: NSp
<b>Asteraceae</b> <i>Arabis alpine</i>	S: O
<b>Brassicaceae</b> <i>Brassica campestris</i> <i>Br. capitata</i> <i>Br. cauliflora</i> <i>Br. pekinensis</i> <i>Br. perviridis</i> <i>Br. rapa</i> <i>Isais tinctoria</i> <i>Iberis amara</i> <i>Raphanus sativus subsp. radicola</i> , сорта: Дунганский местный Жара Красный с белым кончиком Красный великан Рубин <i>Rh. sativus subsp. convar Loba</i> , сорт Октябрьская <i>Sinapis alba</i> <i>S. nigra</i>	S: VC, Dis, M S: O S: O S: CIM, Dis L: NSp S: VC, CIM L: NSp S: O S: CIM S: M S: CIM S: VC S: CIM S: CIM S: VC, CIM N: Sp, S: CIM, Dis
<b>Chenopodiaceae</b> <i>Chenopodium giganteum</i> <i>Ch. quinoa</i> <i>Ch. murale</i>	L: C1Sp, S: Sp N: NSp L: NSp
<b>Solanaceae</b> <i>Nicotiana tabacum</i> , cv. Xanthi	L: Ndot

Примечание. O – бессимптомное заражение растений.

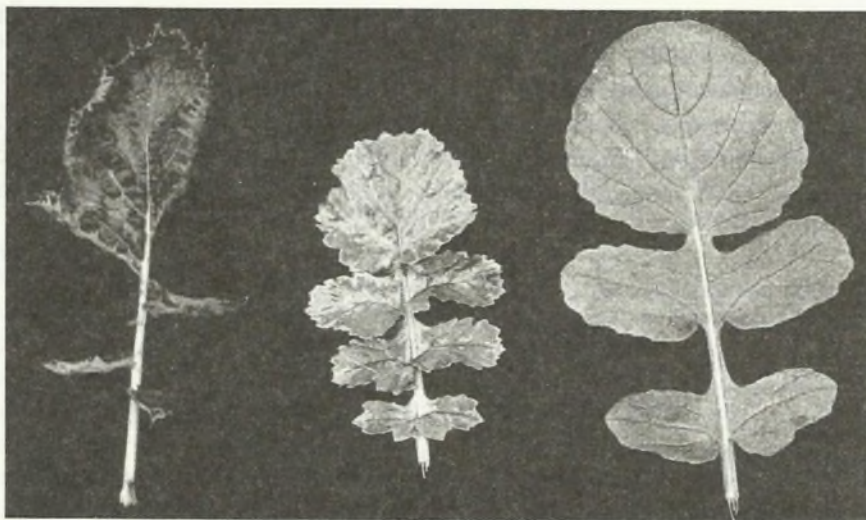


Рис. 90. Симптомы на листьях растений лобы и редиса, инфицированных вирусом мозаики турнепса, справа – лист здорового растения редиса

заражал в основном растения из семейства *Brassicaceae* (рис. 90). Растения редьки китайской *R. sativus* L subsp. *sinensis* (Mill.) convar *Loba sazon* оказались надежными растениями-хозяевами для поддержания и накопления вируса в целях очистки.

Семенная передача для дальневосточного изолята ВМТ не установлена. Вирус легко передавался механически и тлей *Myzus persicae*. Физические свойства вирионов ВМТ соответствовали следующим показателям: ТТИ – 70 °С, ПСИ – 2 сут.

Вирусные частицы имели нитевидную форму длиной 720–750 нм и шириной 12 нм. В эпидермисе листа лобы, зараженного вирусом, наблюдались вирусные включения в виде Х-тел (рис. 91).

Для получения очищенного препарата вирус накапливали в растениях лобы и на 12–15-й день листья снимали. Причем было замечено, что концентрация вируса в них держалась на высоком уровне довольно продолжительное время, поэтому листья можно было использовать для последующих выделений вируса по мере их отрастания. Симптомы в виде посветления жилок листа, хлоротичной крапчатости, а позже – морщинистой мозаики наиболее ярко проявлялись на 12–17-й день после инокуляции (в зависимости от времени года, температуры и освещения). Для очистки вируса использовалась стандартная методика, применяемая для потивирусов (Гнutowa и др., 1991). Выход вируса составил 70–100 мг/кг,  $A_{280/260} = 1,18–1,20$ . Специфический коэффициент  $E_{0,1\%}^{1\text{ см}} = 2,4$ .

Электрофоретический анализ в ПААГ вирусспецифических белков вируса показал, что свежесвыделенный препарат имел два полипептида с м.м. 32 и 38 кДа. В процессе хранения в препарате появлялись пептиды с большей электрофоретической подвижностью. С помощью ограниченного протеолиза показано, что полипептид с м.м.



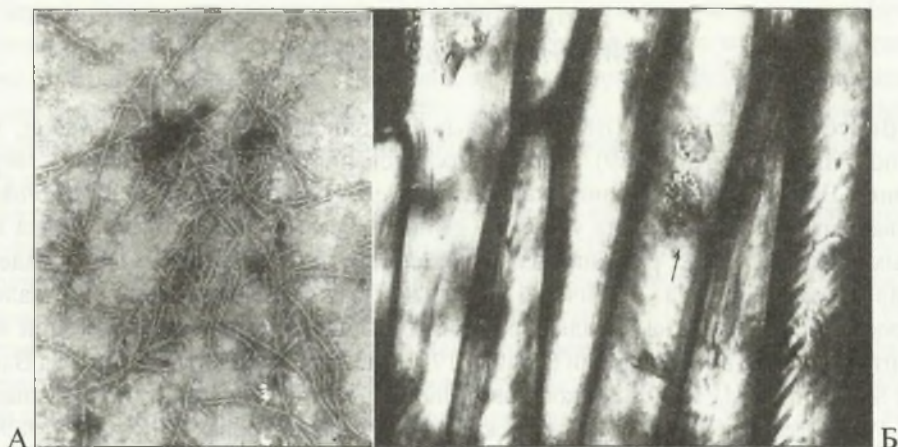


Рис. 91. Электронная микрофотография вирионов вируса мозаики турнепса (А) и вирусных включений (показаны стрелкой) в клетках листа инфицированного вирусом редиса (Б)

вирусом мозаики

Растения редьки ки-  
зались надежными  
очистки.

установлена. Вирус  
свойства вирионов  
– 2 сут.

– 750 нм и шириной  
вирусные вклю-

в растениях лобы и  
концентрация вируса в  
листьях, поэтому листья  
по мере их отраста-  
тельности, а позже –  
после инокуляции  
очистки вируса ис-  
использованы (Гнутова и др.,  
специфический коэф-

белков вируса пока-  
32 и 38 кДа. В про-  
рофоретической под-  
полипептид с м.м.

32 кДа являлся продуктом деградации капсидного белка с м.м. 38 кДа. Электрофорезом в 0,8 %-ном агаровом геле был выявлен один компонент РНК с м.м. 3,5 мДа.

Вирус проявлял свойства умеренного иммуногена и антигена. Максимальный титр специфических антител в РДД был 1:16–1:32, в непрямом варианте ИФА – 1:3200–1:6400. Полученная антисыворотка послужила основой для приготовления иммунодиагностикумов для ИФА. По результатам РДД, РИЭФ и ИФА, вирус имел антигенное родство с имеющимися у нас в коллекции потивирусами (дальневосточные изоляты) – ВМС, УВК и АВК, ВМГ, ВТБ, ВЖМФ; сибирский изолят – ВЖКЛ.

На основании полученных результатов по биологическим свойствам дальневосточный изолят ВМТ отнесен нами к группе обычных штаммов. Отличительной особенностью изученного изолята была высокая ТТИ (70 °С) по сравнению с другими известными штаммами. По литературным данным, встречаются штаммы ВМТ с ТТИ 30–60 °С (Кобыко, Мау, 1989). Следовательно, дальневосточный изолят ВМТ являлся одним из самых термостабильных из известных штаммов ВМТ. Кроме того, он не инфицировал табак клейкий, бессимптомно заражал *Brassica oleraceae* var. *Capitata* и вызывал симптомы вирусного поражения на мари квиноа, а у цветной и краснокочанной капуст заболевание протекало в латентной форме. Эти данные, исходя из принятой классификации штаммов, позволяют дальневосточный изолят ВМТ отнести к группе обычных штаммов. От изолята вируса, выделенного из гороха, и марокканского штамма, обнаруженного на горчице белой (Fischer, Lockhart, 1976; Provvidenti, 1978), он отличался тем, что не заражал горох и другие бобовые культуры, в то время как симптомы на растениях из семейства крестоцветных были сходны (Толкач и др., 1991).

Итак, на юге Приморского края идентифицирован ВМТ, который по нашим и литературным данным, можно отнести к группе обычных штаммов вируса.

Вирус мозаики арбуза 1  
*Watermelon mosaic virus 1*

Вирус мозаики арбуза (ВМА) впервые был описан еще в 1933 г. (Walker, 1933; цит. по: Milne, Grogan, 1969). Первые исследования были проведены в Северной Америке. Вирус во Флориде поражал растения семейства тыквенных *Cucurbitaceae* и вызывал мозаичность листьев у арбуза, дыни, тыквы, огурца, а также у ряда культурных и дикорастущих растений из других семейств (Anderson, 1954). К. Андерсон описал 2 штамма вируса – типичный и желтый. Позднее неоднократно сообщалось о распространении ВМА на посадках различных овощных тыквенных растений в разных штатах США: в Калифорнии (Freitag, 1952), Южной Каролине (Sammons, Barnett, 1984; Sammons et al., 1989), Висконсине (Lindberg et al., 1956), Вирджинии (Butterfield et al., 1983), Техасе (Webb, 1961), а также на Гавайских островах (Cho et al., 1989).

Изучение северо-американских изолятов вируса позволило Webb и Scott (1964) на основании круга поражаемых тест-растений, серологической диагностики и невозможности перекрестной защиты разделить их на два типа – ВМА 1 и ВМА 2. Первоначально считалось, что ВМА 1 и ВМА 2 являлись штаммами одного и того же вируса. Позднее их разделили на два самостоятельных вируса. Ранее считалось, что ВМА 1 заражал растения только на американском континенте в отличие от ВМА 2, распространенного повсеместно. На этом основании последний получил название обычного вируса мозаики арбуза, а ВМА 1 – специфического вируса мозаики арбуза (цит. по: Horvarth et al., 1975 б). Обе разновидности вируса довольно широко распространены в Мексике – на растениях арбуза и тыквы (Grogan et al., 1959), в Чили – на тыкве крупноплодной *Cucurbita maxima*, дыне, кабачке (Auger et al., 1974), в Венесуэле и Сальвадоре – на арбузе (Lasta, 1968; Diaz, 1972). В Бразилии ВМА 1 является одним из самых распространенных вирусов на овощных культурах семейства *Cucurbitaceae* (Yuki et al., 2000).

В Африке заболевание мозаики арбуза известно с 60-х гг. XX века, когда Van Regenmortel et al. (1962) обнаружил и изучил свойства южно-африканского изолята ВМА из кабачка *Cucurbita pepo* L. var. Caserta Bush. Позднее вирус был изолирован из тыквенных растений в Марокко (Purcifull, Niebert, 1979). Примечательно, что оба изолята ВМА 1 и ВМА 2 были идентичны по антигенным свойствам, но неродственны по биологическим (Meer, Garnett, 1987). Это позволило Р. Веббу и Х. Скотту (Webb, Scott, 1965) предположить о существовании третьего вируса – мозаики арбуза (южно-африканский изолят). В настоящее время южно-африканские изоляты выделены в самостоятельный вид – марокканский вирус мозаики арбуза *Moroccan watermelon mosaic virus (MWMV)* рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae* (Regenmortel et al., 2000).

В Судане распространен ВМА 1 (Ahmed, 1981), в Саудовской Аравии – ВМА 2 и марокканский вирус мозаики арбуза (AlSaleh, AlShahwan, 1997). В Иране ВМА 1 отмечен в посадках арбузов (Ebrahim-Nesbat, 1974). ВМА 2 идентифицирован из тыквы в Иордане. В этой стране эпифитотии данного вируса на тыквенных овощных культурах составляют 99 % случаев всех вирусных инфекций (Karam, Al-Musa, 1984).

Первые ре-  
прошлого стол-  
*maxima* Duch-  
о большом уде-  
который пора-  
вируса в Чешс-

Большой  
культурным ра-  
ней главным об-  
огурцов, арбуз  
В Китае прира-  
(Глутова и др.,

В Индии  
мускатной (Jan-  
1977 б). Симво-  
сти и темно-к-  
*Trichosanthes*  
Изучение свой-

В Австра-  
ства *Cucurbita*  
1978). На оссе-  
1980).

Сведения  
пор не было. Н  
Казахстане, где  
Фегла, 1972; В  
виде слабого  
ных пятен, чер-  
отставали в ро-  
пятнистость, с

Таким об-  
миру и являют-  
*Cucurbitaceae*. С  
ет, по разным  
тений (Demski-  
каду, то не про-  
(Mansour, Al-M

Биологич-  
ВМА 1 и ВМА  
ВМА 1 имеют  
ейства *Cucur-  
флоридский) в*



Первые результаты о выявлении ВМА 1 в Европе были получены в начале 60-х гг. прошлого столетия, когда его обнаружили на растениях арбуза и тыквы *Cucurbita maxima* Duch. и *C. pepo* сначала в Венгрии, затем в Болгарии. В 1977 г. сообщалось о большом ущербе в Германии (Hein, 1977) и Франции (Lecoq et al., 1982) от ВМА 1, который поражал посадки кабачков цуккини. Есть сведения об обнаружении этого вируса в Чешской республике.

Большой ущерб ВМА 1, ВМА 2 и марокканский вирус мозаики арбуза наносят культурным растениям семейства *Cucurbitaceae* в Азии. В Японии и Китае распространены главным образом ВМА 2. Так, в Японии отмечена эпифитотия ВМА 2 на посадках огурцов, арбузов, гороха и нута культурного *Cice arietinum* (Yamamoto et al., 1982). В Китае природными хозяевами вируса являются тыква, дыня, арбуз, горох, фасоль (Гнутова и др., 1996). На Тайване, наоборот, встречается ВМА 1 (Kuan et al., 1999).

В Индии ВМА обнаружен на тыкке крупноплодной (Tripathi, Yoshii, 1985), тыкке мускатной (Jain et al., 1998), огурце, тыкке восковой и на посудной тыкке (Bhargava, 1977 б). Симптомы вирусного поражения наблюдали в виде мозаичной крапчатости и темно-зеленой пузырчатости листьев, а на растении трихозанта двудомного *Trichosanthes dioica* – легкого хлороза листьев и карликовости (Bhargava, 1977 б). Изучение свойств изолятов позволило считать, что это ВМА 1.

В Австралии до 1970 г. довольно часто отмечалось заболевание растений семейства *Cucurbitaceae*, вызванное ВМА 2. Позднее там был обнаружен ВМА 1 (Greber, 1978). На соседних островах Океании ВМА 1 поражал тыкву, огурцы, арбузы (Thomas, 1980).

Сведений о распространении ВМА 1 и ВМА 2 в России в литературе до сих пор не было. На территории бывшего СССР ВМА отмечен на Украине, в Армении и Казахстане, где его обнаружили на арбузе и дыне (Московец и др., 1970; Московец, Фегла, 1972; Власов, 1992). На листьях арбуза вирусные симптомы проявлялись в виде слабого хлороза, мозаики из зеленых полос вдоль жилок, пузыревидных зеленых пятен, чередующихся с хлоротичными междужилковыми участками. Растения отставали в росте, хуже завязывались плоды, на плодах арбуза и дыни вирус вызывал пятнистость, они могли изменять форму и уменьшаться в размерах.

Таким образом, ВМА 1 и ВМА 2 в настоящее время распространены по всему миру и являются одними из вредоносных патогенов культурных растений семейства *Cucurbitaceae*. Снижение урожая арбуза и тыквы в случаях эпифитотии ВМА достигает, по разным данным, от 9–43 % до 19–73 % и зависит от сроков инфицирования растений (Demski, Chalkley, 1972, 1974). Если всходы заражались вирусом в первую декаду, то не происходило образование плодов, и тогда потеря урожая составляла 100 % (Mansour, Al-Musa, 1982).

**Биологические свойства.** Изучению различий по биологическим свойствам ВМА 1 и ВМА 2 посвящено большое количество работ. Оказалось, что изоляты ВМА 1 имеют узкий круг чувствительных хозяев, ограниченный растениями семейства *Cucurbitaceae* (Webb, Scott, 1965). Лишь некоторые его изоляты (например, флоридский) вызывают локальные поражения у мари квиноа (Provvidenti, Gonsalves,

1984) и мари амарантоцветной (Cohen, Nitzany, 1963). В то же время ВМА 2 поражает растения, принадлежащие к различным ботаническим семействам, как в природных условиях, так и при искусственной инокуляции (Horvath, 1979). Автор приводит список экспериментальных тест-растений для ВМА 2, включающий 71 вид из 17 семейств. Восприимчивые к вирусу растения относились к семействам *Euphorbiaceae*, *Martynaceae*, *Aposynaceae*, *Aizoaceae*, *Umbelliferae*, но наиболее чувствительные – растения из семейств *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Malvaceae*.

Первый перечень растений семейства *Cucurbitaceae*, чувствительных к ВМА, был представлен К. Андерсеном (Anderson, 1954), который изучал северо-американские изоляты вируса. Им же подробно были описаны симптомы заболевания. Позднее этот список пополнялся другими авторами (Horvath et al., 1975 b; Bhargava, 1977 b). В круг поражаемых растений были включены: кабачок *Cucurbita pepo* L., тыква крупноплодная *Cucurbita maxima* Duch., тыква мускатная *Cucurbita moschata* L., огурец посевной *Cucumis sativus* L., арбуз *Citrullus vulgaris citroides* Bailey, луффа цилиндрическая *Luffa cylindrica* Roem., тыква фигомитная *Cucurbita ficifolia* Schrad., патиссон *C. pepo* var *patissonina* Duch., *Echinocystis lobata* Torr et Gray, различные виды *Lagenaria* и т.д. В экспериментах с индийскими изолятами ВМА были отмечены положительные реакции на инфекцию при заражении растений 80 видов и сортов семейства *Cucurbitaceae* (Bhargava, 1977 b). Вирусная инфекция у растений овощных культур рода *Cucurbita* (тыква, кабачок, патиссон и др.) проявлялась в виде хлороза тканей листа, карликовости, деформации. Обычно развивалась крапчатость в виде окаймления жилок, возможна также постепенно усиливающаяся зеленая пузырчатость на фоне хлоротичных участков ткани между жилками. Вершины листьев часто нитевидно вытягивались. Плоды были мелкие, иногда деформированные, с недоразвитыми семенами. В отдельных случаях плоды не образовывались совсем.

Растения луффы цилиндрической рода *Luffa* реагировали на инфекцию ВМА мелкими слегка хлоротичными пятнами или кольцами, а также умеренным окаймлением жилок. Симптомы заболевания у огурцов проявлялись в виде яркой мозаики, у арбуза – обычной мозаики, хлоротичности, деформации и нитевидности листьев, пестрой расцветки плодов (Webb, 1971; Demski, Chalkley, 1974).

Реакции вышеперечисленных видов растений на инфицирование ВМА 1 и ВМА 2 были схожи. Вместе с тем имелись и отличия. В частности, Webb и Scott (1965), а позже и другие авторы отмечали, что луффа острорезная *Luffa acutangula* устойчива к ВМА 2, но чувствительна к ВМА 1. При заражении этого вида различными изолятами ВМА 1 сначала наблюдали посветление жилок на инокулированных листьях, а затем системную хлоротичную пятнистость. В то же время огурец *Cucumis metuliferus* L. при инфицировании был устойчив к инфекции ВМА 1, а на заражение ВМА 2 реагировал системной мозаикой (Provvidenti, Robinson, 1974). Авторы предлагают использовать эти тест-растения при разделении смешанной инфекции ВМА 1 и ВМА 2.

**Передача** вируса мозаики арбуза происходит не только механически, но и с помощью переносчиков. Основными векторами ВМА являются тли *Aphis gossypii* Glov. и *M. persicae*, которые переносят вирус непersistентно (Anderson, 1954). Изучалась



динамика распространения инфекции ВМА в полевых условиях и ее связь с численностью тлей на посадках овощных тыквенных культур (Adlerz, 1974). Обнаружено, что первые симптомы вирусного заболевания на растениях в полевых условиях появляются вскоре после миграции тлей с дикорастущих на культурные растения. Кроме того, известны дикорастущие и сорные растения, являющиеся резервуарами ВМА, например индийский огурец *Momordica charantia*. Эти данные дают основание отнести ВМА к природно-очаговым инфекциям.

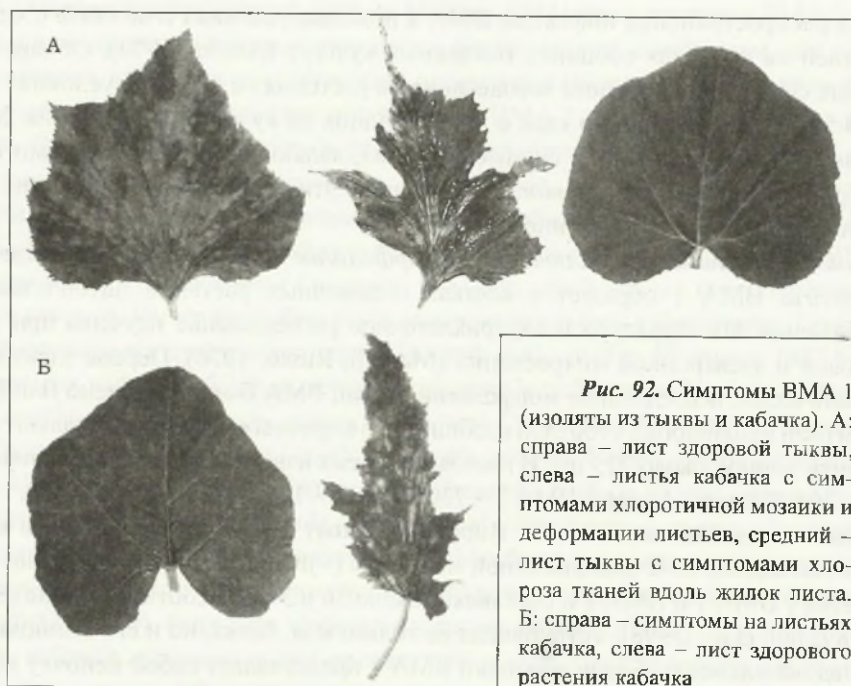
**Цитоплазматические включения и морфология вирионов.** Как представитель рода *Potyvirus* ВМА 1 образует в клетках пораженных растений цитоплазматические включения. Их структура и внутриклеточное расположение изучены при помощи световой и электронной микроскопии (Martelli, Russo, 1976). Первое электронно-микроскопическое исследование морфологии частиц ВМА было проведено Ван Регенмортемом (Van Regenmortel, 1960). Он сообщил, что вирионы вируса представляют собой гибкие нити длиной около 725 нм. В настоящее время известно, что размеры вирионов ВМА 1 – 760–800 нм × 12 нм, а ВМА 2 – 730–765 нм × 12 нм (Brunt et al., 1997).

**Физико-химические свойства.** Вирионы состоят из белковой оболочки и заключенной в ней одноцепочечной линейной молекулы (+)РНК. М.м. белка незначительно различается у ВМА 1 и ВМА 2 и составляет около 36 и 34 кДа соответственно (Suzuki et al., 1989; Jain et al., 1998). Установлена не только м.м. белка, но и его аминокислотная последовательность. Белок оболочки ВМА 1 представляет собой цепочку из 285–287 аминокислот в зависимости от изолята, в то время как у ВМА 2 он состоит из 281 аминокислотного остатка (Yu et al., 1989; Quemada et al., 1990; Bateson et al., 1994).

**Физические свойства** вирионов ВМА впервые изучены в 1962 г. (Van Regenmortel et al., 1962). По данным разных авторов, ТТИ ВМА составляет от 55–60 °С (Anderson, 1954; Fischer, Lockhart, 1974) до 60–65 °С (Van Regenmortel et al., 1962). ПРС ВМА 1 также варьировалось от  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  (Grogan et al., 1959; Auger et al., 1974) до  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  (Anderson, 1954; Webb, Scott, 1965). Данные по ПСИ *in vitro* при комнатной температуре у разных авторов не одинаковы и составляют от 26 сут (Grogan et al., 1959; Anderson, 1954) до 28 сут (Lindberg et al., 1956) и даже до 42-х (Tripathi, Yoshii, 1985). В настоящее время для типичного штамма ВМА 1 ТТИ – 60 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  и ПСИ – от 40 до 60 сут (Brunt et al., 1997) (литературный обзор цит. в основном по: Чернявская, 2003).

Можно сделать вывод, что ВМА 1 и ВМА 2 – два самостоятельных вируса. Несмотря на сходство, вирусы имеют существенные отличия, главное из которых – узкий круг хозяев для ВМА 1, ограниченный представителями семейства *Cucurbitaceae*.

**Дальневосточные изоляты ВМА.** Идентификация неизвестного патогена, выявленного на растениях тыквы (ВМАт) и кабачка (ВМАк) с вирусоподобными симптомами в двух районах Приморского края в 2000 г., основывалась на данных изучения морфологии вирионов, результатах биологического тестирования, антигенных и физико-химических свойствах вирусных белков. Она показала, что дальневосточные изоляты ВМА относятся к ВМА 1 (Толкач, Чернявская, Гнutowa, 2001). Образец ка-



**Рис. 92.** Симптомы ВМА 1 (изоляты из тыквы и кабачка). А: справа – лист здоровой тыквы, слева – листья кабачка с симптомами хлоротичной мозаики и деформации листьев, средний – лист тыквы с симптомами хлороза тканей вдоль жилок листа. Б: справа – симптомы на листьях кабачка, слева – лист здорового растения кабачка

бачка имел симптомы хлоротичной мозаики и деформации листьев, а образец тыквы – хлороз тканей вдоль жилок листа (рис. 92).

В электронном микроскопе в препаратах, приготовленных из листьев пораженных растений, были обнаружены нитевидные частицы длиной 740–760 нм, характерные для вирусов рода *Potyvirus* (рис. 93).



**Рис. 93.** Электронная микрофотография вирионов вируса мозаики арбуза ( $\times 31000$ ) (фото Л.Н. Лапшиной)



Экспериментальный круг тест-растений включал 60 видов и сортов из семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*. В ходе исследования было обнаружено, что изоляты из кабачка и тыквы заражают только растения, принадлежащие к семейству *Cucurbitaceae*.

Вирусы легко передавались механически на *Cucumis melo* L., *C. sativus* L., *C. maxima* Duch., *C. pepo* L., *C. pepo* var. *patisson* Duch. Изолятом из кабачка также удалось заразить *Luffa cylindrica* (L.) Voem. Изолятом из тыквы крайне редко инфицировалась *Phaseolus vulgaris* (L.) Savi cvs. Norwegian и Perlicka (табл. 45).

Симптомы, индуцируемые изолятами у тест-растений, были типичны для ВМА 1: системные мозаика и крапчатость, темно-зеленое окаймление жилок, вздутия листовой пластинки, деформация и уродливость листьев (рис. 94).

Дальневосточными изолятами ВМА 1 не удалось заразить *Citrullus vulgaris* Schrad., *Cucumis metuliferus* E. Mey., а также растения из семейств: *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*.

Анализ симптомов заболевания чувствительных к заражению растений *C. sativus*, *C. maxima*, *C. pepo* и *C. pepo* var. *patisson* показал незначительные различия между ВМАт и ВМАк. Так, ВМАт не заражал растения *C. sativus* сорта Миг, *C. maxima* сортов Волжская серая и Крошка. Растения *C. maxima* сорта Зорька, напротив, были устойчивы к ВМАк, но восприимчивы к ВМАт.

Итак, круг растений, чувствительных к идентифицируемым нами изолятам, соответствовал литературным данным по биологическим свойствам ВМА 1 (Horvath et al., 1975 а, б; Bhargava, 1977 а, б; Provvidenti et al., 1984). Отличительной особенностью дальневосточных изолятов явилась их неспособность экспериментально заражать механически и с помощью тлей растения арбуза *C. vulgaris*.

Результаты наших экспериментов показали, что оба исследуемых изолята ВМА 1 легко передаются тлями непersistентным способом. Это подтвердило предположение В.Ф. Толкач, которая первая изучала биологические свойства дальневосточных изолятов ВМА о принадлежности ВМАк и ВМАт к роду *Potyvirus*.

Физические свойства вирионов исследуемых дальневосточных изолятов ВМА 1 соответствовали литературным данным. ВМАт инактивировался при 65 °С, сохранял инфекционность в течение 4 сут и имел ПРС – 10<sup>-5</sup>. Для ВМАк ТТИ составила 70 °С, ПСИ – 5 сут, ПРС – 10<sup>-5</sup>–10<sup>-6</sup>. Следует отметить более высокую, чем у описанных в литературе изолятов ВМА 1, температуру инактивации вирионов ВМАк. Кроме того, для обоих дальневосточных изолятов ВМА был характерен непродолжительный период сохранения инфекционности по сравнению с изолятами ВМА, описанными в литературе.

Для накопления ВМА 1 с целью получения очищенного препарата в эксперименте использовали молодые растения тыквы. Максимальную концентрацию вируса отмечали через 3 нед после инокуляции. Неоднократное выделение очищенного препарата ВМА 1 проводили по методу В.К. Новикова с соавтр. (1982). Лучший выход ВМАт составил 18,33 мг, а ВМАк – 12,5 мг на 100 г зеленой массы. Вирус имел ха-

Реакция тест-растений на заражение изучаемыми изолятами ВМА

Семейство, вид и сорт растения	ВМА <sub>Т</sub>	ВМА <sub>К</sub>
<b>Cucurbitaceae Juss.</b>		
<i>Cucumis melo</i> L., сорт Дубовка	S: ClVe, Dis	S: Sp, M
<i>C. sativus</i> L., сорта:		
Водолей	S: M, GrMot	S: M, Dis
Дальневосточный -6	S: VeBd, Dis	S: VeBd, Dis
Дальневосточный-27	S: M, Dis	S: M, Dis
Каскад	S: M	S: ClVe, GrMot
Кит	S: RM	S: GrMot
Маркетер	S: ClVe, Dis	S: VeBd
Миг	—*	S: ClVe, GrMot
<i>Cucurbita maxima</i> Duch., сорта:		
Витаминная	S: M, Dis	S: ClMot
Волжская серая	—	S: ClVe, VeBd
Голосеменная	S: M, Dis	S: M
Зорька	S: VeBd, GrMot	—
Крошка	—	S: ClMot
Кустовая грибовская	S: VeBd, Sp, Dis	S: M, Dis
Оранжевая	S: M, Dis	S: M, Dis
<i>C. pepo</i> L., сорта:		
Аэронавт	S: VeBd, GrMot	S: VeBd, Dis
Грибовский	S: ClVe	S: ClVe, ClMot
Зебра	S: ClVe	S: ClMot, Dis
Куанд	S: ClVe, Dis	S: VeBd
Скворушка	S: ClVe, M, Dis	S: VeBd, Dis
Черный красавец	S: Sp, Dis	S: ClMot, M, Dis
<i>C. pepo</i> var. patisson Duch., сорта:		
Белый	S: M, Dis	S: VeBd
Диск	S: M, GrMot, Dis	S: VeBd, Dis
Зонтик	S: GrMot, M, Dis	S: VeBd
Оранжевый	S: M, Dis	S: ClVe
Ролик	S: VeBd	S: M, Dis
Солнышко	S: ClVe, VeBd	S: M, Dis
<i>Luffa cylindrica</i> (L.) Boem.	—	S: M, Dis
<b>Fabaceae Lindl.</b>		
<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) Savi., cvs.:		
Norvegian	S: Dis, ClM	—
Perlicka	S: ClMot	—

\*Отсутствие симптомов вирусного поражения

актерный нуклеопротеидный спектр с минимумом при 240 нм и максимумом при 260 нм.

Оказалось, что ВМА 1 не теряет свою инфекционность в листьях тыквы при температуре -18 °С в течение 6 мес.



Таблица 45

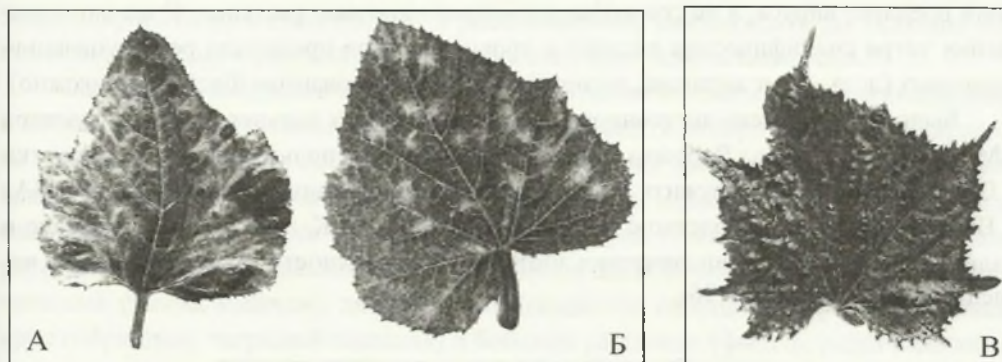


Рис. 94. Симптомы поражения растений изолятами ВМА. А – темно-зеленые вздутия, мозаика на листьях *C. pepo* (цукини) сорта Зебра (изолят из кабачка), Б – хлоротичная пятнистость на листьях *Cucurbita maxima* (тыква) сорта Кустовая грибовская (изолят из тыквы), В – темно-зеленая крапчатость на листьях *C. sativus* (огурец) сорта Каскад (изолят из кабачка)

Принадлежность ВМАк к роду *Potyvirus* подтверждала электрофорграмма, из которой следовало, что исследуемые потивирусы имели сходную структуру белкового компонента вирионов, м.м. основного пептида – 34–36 кДа, наличие нескольких полос у ВЖМФ и ВГТ являлось результатом протеолиза основного белка под действием растительных протеаз при хранении более 1–2 нед. Электрофоретически не отмечено особых различий в капсидных белках исследуемых вирусов. Электрофорез ВГТ, ВЖМФ и ВМАк выявил зону преципитации основных и мажорных вирусных белков, близкую по м.м. к вирусным белкам потивирусов (рис. 95).

Полученная поликлональная антисыворотка к ВМА была строго специфична, не реагировала с соком здоровых растений, но титр ее в РДД был невысокий (1:16–1:32), если в качестве антигена брали сок растения тыквы, инфицированной ВМА 1. В реакции в качестве геля использовали 0,8 %-ный агар. Кроме того, обязательным условием для получения положительных реакций ВМА 1 со специфическими антителами было разрушение длинных нитей вириона на фрагменты. С этой целью применяли несколько способов: обработка ультразвуком, нагревание на водяной бане вируса до 45 °С или разрушение вирионов попеременным замораживанием и оттаиванием вирусной суспензии. Однако физические методы воздействия на вирусные частицы были мало эффективны, поэтому использовали 1 %-ный ДСН.

Титр антисыворотки был на 2–3 порядка выше, если антигеном служил чи-

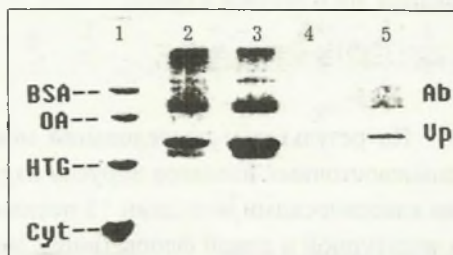


Рис. 95. Электрофорграмма трех видов рода *Potyvirus* (фото М.В. Сапоцкого). 1 – белки-маркеры, 2 – ВЖМФ, 3 – ВГТ, 4 – контроль, 5 – ВМА

стый препарат вируса, а не сок инфицированного вирусом растения. С целью повышения титра специфических антител в крови кроликов проводили реиммунизацию животных (доза – 2 мг антигена, который вводили с адьювантом Фрейнда подкожно).

Было подтверждено антигенное родство выявленных дальневосточных изолятов ВМА 1 с вирусами рода *Potyvirus* – УВК, ВЖМФ, ВГТ. Использование антисыворотки к ВМАт позволило обнаружить высокую степень антигенного родства между ВМАт и ВМАк и отдаленное родство с ВГТ, ВМС, ВЖМФ, УВК, что свидетельствовало о наличии видо- и родоспецифических эпитопов на поверхности капсидных белков исследуемых вирусов (рис. 96).

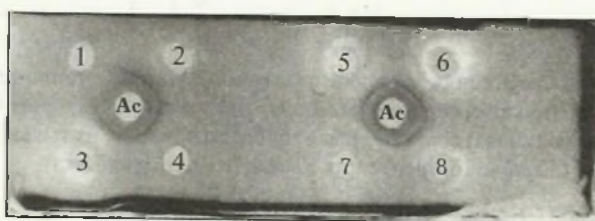


Рис. 96. Определение антигенного родства ВМА 1 с другими потивирусами в РДД. В центральных лунках – Ас к ВМА, в периферических – антигены: 1 – контроль (сок здорового растения), 2 – ВМАт, 3 – ВГТ, 4 – УВК, 5 – ВМАк, 6 – ВЖМФт, 7 – изолят ВЖМФ из клевера, 8 – изолят ВЖМФ из акубы японской

Таким образом, получены данные по морфологии и физическим свойствам вирионов двух изолятов вируса – ВМАт и ВМАк, изучен экспериментальный круг растений-хозяев, симптоматология заболевания, возможности передачи тлями неперсистентно, физико-химические и антигенные свойства капсидных белков. Эти критерии позволили сделать вывод о том, что на Дальнем Востоке выявлен вирус мозаики арбуза 1 рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*, поражающий овощные растения семейства *Cucurbitaceae*. Идентифицирован новый вирус не только для дальневосточного региона, но и России в целом.

\*\*\*

По результатам исследований можно подвести некоторые итоги по изучению дальневосточных изолятов вирусов из рода *Potyvirus*. Проведено комплексное изучение классическими методами 13 потивирусов, обнаруженных на различных растениях культурной и дикой флоры (вирус мозаики клевера гибридного). Изучено видовое разнообразие ВЖМФ, ВОМФ, ВМС и дана биологическая, физико-химическая и антигенная характеристика трем группам штаммов – УВК<sup>0</sup>, УВК<sup>N</sup>, УВК<sup>C</sup>. Показаны их различия не только по биологическим, физико-химическим свойствам, но и по антигенной специфичности капсидных белков. Локализован линейный эпитоп капсидного



белка некротического штамма УВК в районе 198–208 аминокислотных остатков полипептидной цепи, он явился родоспецифичным эпитопом потивирусов.

Определено таксономическое положение по биологическим, физико-химическим и антигенным свойствам впервые выявленных и идентифицированных потивирусов не только в ДФО, но и в России. Это – вирусы мозаики арбуза 1, гравировки табака, традесканции белоцветковой, мозаики гиппеаструма, мозаики клевера гибридного, сибирского изолята вируса желтой карликовости лука. Проведена сравнительная характеристика свойств дальневосточных изолятов ВЖМФ, впервые обнаруженных на овощных (тыква, кабачки), декоративных (гладиолус гибридный, аукуба японская, ирис гибридный, тигридия павлинья) и бобовых растениях (фасоль, различные виды клевера, горох, бобы конские). Дана характеристика трем азиатским изолятам ВОМФ, идентифицированным из растений фасоли. Образцы с вирусоподобными симптомами (китайский, северокорейский и российский дальневосточный) были обнаружены во время совместных фитосанитарных обследований бобовых культур в приграничных странах АТР. Выявлен ВЖКЛ, поражающий луки в Сибири. Изучено видовое разнообразие вируса мозаики сои – самого распространенного и вредоносного в посадках сои и А-вируса картофеля, не имеющего широкого распространения на картофеле в ДФО.

## Семейство Flexiviridae

В начале этого столетия группа известных фитовирусологов на основании убедительных результатов обосновала выделение нескольких родов вирусов растений в отдельное семейство, получившее название *Flexiviridae* (Adams et al., 2005). Название семейства непосредственно отражало данные по морфологии флексивирусов. Вирионы нового семейства – гибкие нитевидные частицы. Аналогичная морфология характерна также для вирусов растений двух других семейств – *Potyviridae* и *Closteroviridae*, но принципиальной основой для выделения самостоятельного семейства *Flexiviridae* явилось то обстоятельство, что флексивирусы обладают характерным, отличным от потивирусов и кластеровирусов, планом строения генома и репликативные и структурные белки флексивирусов имеют очевидное филогенетическое родство.

Новое семейство *Flexiviridae* образовали в 2005 г. В его состав вошли 8 дефинитивных родов, сформированных МКТВ к 2000 г. (*Potexvirus*, *Mandarivirus*, *Allexivirus*, *Carlavirus*, *Foveavirus*, *Capillovirus*, *Vitivirus* и *Trichovirus*), один предполагаемый род *Citrivirus* (*Citrus leaf blotch virus* (*CLBV*) и несколько видов, не включенных пока ни в один из родов – *Banana mild mosaic virus* (*BanMMV*), *Cherry green ring mottle virus* (*CGRMV*), *Cherry necrotic rusty mottle virus* (*CNRMV*), *Potato virus T* (*PVT*), *Sugarcane striate mosaic-associated virus* (*SCSMaV*) и недавно описанный *Banana virus X*. Ниже указаны типовые представители дефинитивных родов семейства *Flexiviridae*.

### Таксономическая структура семейства *Flexiviridae*

Роды:	Типовой вид
<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i>
<i>Mandarivirus</i>	<i>Indian citrus ringspot virus</i>
<i>Allexivirus</i>	<i>Shallot virus X</i>
<i>Carlavirus</i>	<i>Carnation latent virus</i>
<i>Foveavirus</i>	<i>Apple stem pitting virus</i>
<i>Capillovirus</i>	<i>Apple stem grooving virus</i>
<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i>
<i>Trichovirus</i>	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>

### Род *Allexivirus*

Прототипом рода *Allexivirus* стал X-вирус шалота (XBIII) *Shallot virus X* (*ShVX*). В настоящее время в род вошли следующие виды: *Shallot virus X*, *Garlis miteborne filamentous virus*, *Garlis virus A*, *Garlis virus B*, *Garlis virus B 1*, *Garlis virus C*, *Garlis*



*mite-borne mosaic virus*, *Garlis virus D*, *Garlis virus E*, *Garlis virus X* и неклассифицированный аллексивирус *Shallot mite-borne latent virus*. Кратко остановимся на типовом представителе нового рода *Allexivirus* – X-вирусе шалота.

### X-вирус шалота *Shallot virus X*

Впервые X-вирус шалота был обнаружен российскими вирусологами в 1991 году в растениях лука-шалота сорта Tagar (Vishnichenko et al., 1993). На основании результатов физико-химических, биохимических и электронно-микроскопических исследований авторы пришли к выводу, что присутствующие в исследуемых растениях гибкие частицы представляют собой вирионы неизвестного ранее фитовируса, получившего название «X-вирус шалота» (ХВШ). В течение 1991–1992 гг. в лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН была установлена нуклеотидная последовательность геномной РНК вируса (Капука, Vishnichenko et al., 1992). Эти данные явились окончательным доказательством того, что действительно был открыт не известный ранее вирус. В дальнейшем была получена полноразмерная кДНК-копия геномной РНК ХВШ и разработана биологическая модель, позволяющая исследовать репликацию вируса в протопластах перевиваемой линии клеток сахарной свеклы (Vishnichenko et al., 2000).

**Геном ХВШ** представляет собой одноцепочечную РНК (+)полярности длиной 8890 нуклеотидов (не считая 3'-концевого трека поли(А), организованную в шесть ОРС (рис. 97).

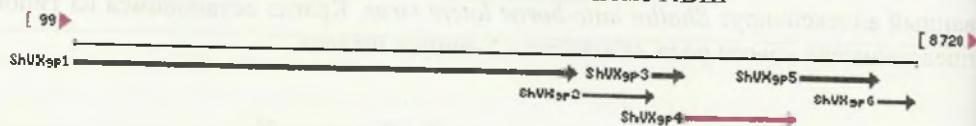
Кроме протяженных ОРС в геноме ХВШ присутствуют также некодирующие 5'- и 3'-концевые и межгенные нуклеотидные последовательности, выполняющие, по-видимому, регуляторные функции.

Гомологии большинства белковых доменов ХВШ обнаруживаются как в пределах рода *Allexivirus*, так и у вирусов растений других родов. Однако кодируемый ОРС 4 белок с м.м. 42 кДа является уникальным, так как его гомологи встречаются только в пределах данного рода. В процессе репликации вируса 42К-белок выполняет, по-видимому, несколько функций, одна из которых – участие в формировании вирионов (Вишнichenко и др., 2002). Кроме того, 42К-белок, вероятно, функционирует в качестве супрессора посттранскрипционного РНК-сайленсинга (Вишнichenко, неопубликованные данные).

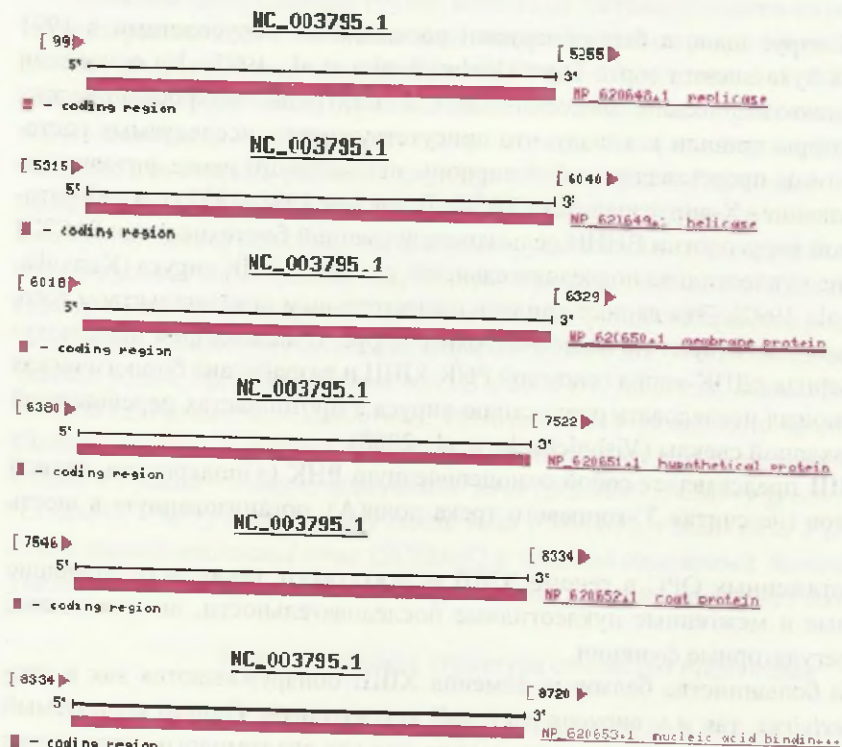
Необычными представляются также свойства и кодируемого ОРС 5 капсидного белка ХВШ. Теоретически, молекулярная масса белка, который синтезируется при трансляции данной последовательности, не может превышать 28 кДа. Однако в экстрактах инфицированных растений и в составе высокоочищенных вирусных препаратов кроме 28К-формы в значительных количествах присутствует серологически родственный капсидный белок с м.м. 37 кДа (Vishnichenko et al., 1993).

Методом иммуноблотинга показано (Вишнichenко и др., 2004), что в листьях инфицированных растений капсидный белок ХВШ присутствует в основном в форме

**А. Расположение открытых рамок считывания в геноме ХВШ**



**Б. Гены и кодируемые ими белки**



**Рис. 97.** Структура генома X-вируса шалота. А – расположение открытых рамок считывания в геноме ХВШ; Б – гены и кодируемые ими белки (по: Вишняченко, 2009)

37К-белка, причем в ювенильных листьях 28К-форма белка обнаруживается лишь в следовых количествах.

Вирусные частицы в листьях на ранних стадиях инфекции отсутствуют и появляются лишь на более поздних стадиях. В корнях инфицированных растений, напротив, превалирует 28К-форма белка, и результаты электронно-микроскопических наблюдений свидетельствуют о том, что уже на ранних стадиях инфекции в корнях в значительных количествах формируются зрелые вирусные частицы.

На основании этих данных В.К. Вишняченко с соавт. (2004) предложена следующая гипотетическая модель функционирования двух форм капсидного белка ХВШ в инфицированных растениях лука-шалота:

– в инф...  
гена капсид...  
28К-форма...  
– сообст...  
белка виру...  
транспорти...  
ны инициро...  
– в состо...  
белка во ф...  
обуловлен...  
ые в знач...  
крайней ме...  
– 37К-...  
ции ХВШ...  
иной стад...  
– механ...  
почечных...  
ции вирус...  
– механ...  
ка ХВШ, в...  
тений обра...  
неизвестно...  
сидного бел...

Интерес...  
рогенность...  
моновирус...  
морфологич...  
диаметром 1...  
этом «тонк...  
затрудняет то...  
В образ...  
ют участие...  
сти протяж...  
РНК, вход...  
1998).

Тонкая...  
лота пока ещ...  
вирионов г...  
Closterovir...  
Однако появ...  
соответств...  
мации в бл...  
е



– в инфицированных растениях шалота имеет место асимметричная экспрессия гена капсидного белка: в листьях синтезируется только 37К-форма, тогда как в корнях 28К-форма;

– собственно капсидным белком ХВШ является 28К-форма, при участии этого белка вирусные частицы формируются в корнях зараженных растений шалота и затем транспортируются в листья. При этом остается неизвестным, способны ли эти вирионы инициировать новые циклы репродукции вируса в листьях;

– в состав зрелых вирионов не включается 37К-форма белка, и присутствие этого белка во фракции вирусных частиц, экстрагированных из листьев шалота, возможно, обусловлено участием его в формировании структур типа «шайб» и «спиралей», которые в значительных количествах обнаруживаются во всех вирусных препаратах; по крайней мере, некоторые из этих структур могут иметь нуклеопротеидную природу;

– 37К-форма, не являясь собственно капсидным белком, играет в цикле репродукции ХВШ какую-то иную роль, например, несет функцию белка-супрессора той или иной стадии РНК-интерференции как антивирусной защитной реакции растения;

– механизм действия 37К-белка состоит, возможно, в связывании коротких двуцепочечных РНК, образующихся в инфицированных растениях в результате индукции вирусом процесса РНК-интерференции;

– механизмы альтернативной и асимметричной экспрессии гена капсидного белка ХВШ, в результате действия которых в корнях и листьях инфицированных растений образуются две различные формы капсидного белка, остаются неизвестными; неизвестно также, чем обусловлено столь значительное различие м.м. двух форм капсидного белка ХВШ.

Интересной особенностью Х-вируса шалота является морфологическая гетерогенность вирусных частиц. Показано (Вишниченко и др., 1996), что в условиях моновирусной инфекции растений инфицированные ХВШ образуют вирионы двух морфологических типов. Первый представлен гибкими частицами длиной 800 нм и диаметром 12 нм, диаметр вирионов второго морфологического типа равен 6 нм, при этом «тонкие» вирионы характеризуются выраженной склонностью к агрегации, что затрудняет точное определение их длины.

В образовании вирусных частиц различных морфологических типов принимают участие обе формы капсидного белка, к тому же нуклеотидные последовательности протяженных (>3000 нуклеотидных остатков) 3'-концевых участков вирионных РНК, входящих в состав двух типов частиц, оказались идентичными (Калюшин и др., 1998).

Тонкая структура двух морфологических типов вирусных частиц Х-вируса шалота пока еще не исследована. Получение содержательной информации о структуре вирионов гибких нитевидных вирусов растений семейств *Potyviridae*, *Flexiviridae* и *Closteroviridae* до недавнего времени представлялось задачей трудно разрешимой. Однако появление метода сканирующей трансмиссивной электронной микроскопии и соответствующего оборудования позволяет рассчитывать на получение такой информации в ближайшее время.

Спектр растений-хозяев аллексивирусов ограничен несколькими видами растений, принадлежащих семействам *Alliaceae*, *Liliaceae*, *Amaryllidaceae* и *Anthericaceae*. В комплексе с карла- и потивирусами аллексивирусы вызывают серьезные заболевания у ряда вегетативно размножаемых овощных и декоративных культур.

Переносчиками аллексивирусов служат некоторые виды клещей из отряда акариформных (в основном *Aceria tulipae*), однако и механическая инокуляция представляет собой достаточно эффективный способ их распространения. Аллексивирусы характеризуются чрезвычайно узким спектром хозяев, ограниченным несколькими видами, входящими в семейство *Alliaceae*. Продуктивная репродукция X-вируса шалота наблюдается только в растениях лука-шалота *Allium cepa* var *aggregatum*; чеснок *Allium sativum* L. поддерживает репродукцию комплекса аллексивирусов, условно обозначаемых как *Garlic virus A, B, C, D, E, X*, представляющих, в сущности, один квазивид. Аллексивирусы были обнаружены также в составе вирусных комплексов, поражающих некоторые виды декоративных луковичных культур, принадлежащих к семействам *Liliaceae*, *Amaryllidaceae* и *Anthericaceae* (Вишниченко и др., 1999). Однако их концентрация в инфицированных растениях оказалась чрезвычайно низкой. Можно предположить, что феномен жесткого ограничения спектра хозяев аллексивирусов обусловлен индукцией в инфицированных растениях высокоэффективного антивирусного механизма посттранскрипционного РНК-сайленсинга (ПТРС), предотвращающего системное распространение вируса, и высокой степенью специфичности соответствующих вирусных белков-супрессоров. Эта гипотеза в настоящее время проверяется экспериментально.

Кроме России аллексивирусы в растениях шалота и чеснока обнаружены в нескольких районах Китая (Chen et al., 2001), в Бразилии (Filho, 2004), Аргентине (Cafrune et al., 2006) и в южных штатах Индии (Majumder et al., 2007). С помощью антител к рекомбинантному белку оболочки ХВШ проведен скрининг различных сортообразцов и растений рода *Allium* и определены ареалы распространения этого вируса в европейской части России (Вишниченко и др., 1999).

В ДФО РФ в настоящее время обнаружены и идентифицированы вирусы, принадлежащие к двум из восьми дефинитивных родов семейства *Flexiviridae*, а именно *Carlavirus* и *Potexvirus*. Скрининг принадлежащих к семейству *Alliaceae* видов других родов – возможных представителей аллексивирусов – не проводился, и информация о распространении этих вирусов на российском Дальнем Востоке отсутствует.

### Род *Carlavirus*

Название рода происходит от начальных букв английского названия типичного представителя группы – *Carnation latent virus*. Род *Carlavirus* довольно многочислен. В него входят более 30 основных и столько же предполагаемых видов, поражающих целый ряд важных сельскохозяйственных культур. Это М- и S-вирусы картофеля, латентный вирус гвоздики, бессимптомный вирус лилии, вирус прижилковой мозаики красного клевера и еще более 20 других вирусов, имеющих не только общую струк-



туру вирионов (Matthews, 1982), но и много других схожих свойств, позволяющих отнести их к одному роду (Matthews, 1991; Zavrjev, 1994, 1999).

**Свойства вирионов.** Вирусы этого рода имеют гибкие нитевидные палочки размером 600–700 нм в длину и  $12 \times 15$  нм в диаметре со спиральной симметрией и шагом спирали 3,4 нм.

**Физико-химические и физические свойства.** М.м. вириона – 60 кДа, плавучая плотность в CsCl –  $1,3 \text{ г/см}^3$ ,  $S_{20,w}$  – 147–176 S, вирионы способны к агрегации.

**Нуклеиновая кислота** представлена одной молекулой линейной (+)онРНК 7,4–8,5 т.о. Некоторые вирусы содержат субгеномные РНК 2,1–3,3 т.о. и 1,3–1,6 т.о., инкапсидируемые в более короткие частицы. Геномная РНК имеет поли(А) на 3'-конце и VPg на 5'-конце. РНК составляет около 6% массы вируса. В составе белковой оболочки карлавирусов в условиях, обеспечивающих стабильность вирионов, удается обнаружить один полипептид оболочки с м.м. 31–36 кДа (Tavantzis, 1983, 1984). Однако в очищенных препаратах карлавирусов часто присутствуют полипептиды с меньшей м.м., относительное содержание которых зависит от метода получения очищенного препарата вируса. В ряде случаев деградация структурного белка карлавирусов оказывается настолько сильной, что в вирусном препарате вообще не удается обнаружить нативный БО; вирионы содержат более короткие полипептиды (Veerisetty, Brakke, 1977).

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

**Организация и репликация генома.** Геномная РНК М-вируса картофеля имеет 6 ОРС, которые кодируют последовательно от 5' к 3'-концу: белок 233 кДа (вероятно, полимеразы), продукты тройного блока генов – 25, 12 и 7 кДа, участвующие в ближайшем транспорте вируса, капсидный белок 34 кДа и белок 11 кДа с неясной функцией. На 5'-конце перед первой ОРС имеется некодирующий участок из 75 нт, 38 нт. и 31 нт. после тройного блока генов и из 70 нт. перед поли(А)-хвостом. Сконструирована библиотека 3'-концевых клонов РНК латентного вируса гвоздики. Секвенирование обнаружило значительное сходство с 3'-концевыми областями 4-х других карлавирусов: М- и S-вирусов картофеля, бессимптомного вируса лилии и вируса *S. helenium*.

3'-концевые открытые рамки считывания этих карлавирусов кодируют белки с м.м. 10,8–16 кДа, содержащие 4 консервативных остатка цистрона, образующих домен «цинкового пальца». Некодирующая 3'-концевая область латентного вируса гвоздики на 60% гомологична соответствующим областям других карлавирусов, которые способны сворачиваться в несколько шпилечных структур. Сигнал полиаденилирования ААТААА сохранился не у всех карлавирусов (Naylor et al., 1990).

Некоторые представители рода образуют агрегаты частиц в виде паракристаллических образований (иногда в виде лент) и включения, содержащие массы эндоплазматического ретикула, перемежающиеся с рибосомами и неагрегированными вирусными частицами в цитоплазме.

**Антигенные свойства.** Карлавирусы являются активными иммуногенами, некоторые из них имеют между собой антигенное родство капсидных белков.

**Биологические свойства.** В природе круг растений, по данным одних исследователей, ограничен, а многих других авторов, – довольно широк. При этом отмечается, что карлавирусы поражают почти один и тот же круг растений.

Карлавирусы обычно легко передаются механически, а большинство из них — тлями полуперсистентно. Известны два вида карлавирусов, имеющих распространение в южных странах, которые передаются белокрылками. Карлавирусы, поражающие бобовые растения, распространяются семенами.

В цитоплазме клеток растений, инфицированных карлавирусами, образуются агрегаты вблизи мембран, включения Х-тела, состоящие из вирусных масс, митохондрий и липидных глобул.

### Вирус бессимптомности лилии *Lily symptomless virus*

Частицы вирионов вируса бессимптомности лилии (ВБЛ) имеют размер  $640 \times 18$  нм. Обычно симптомы на зараженных растениях отсутствуют, но при смешанной инфекции с другими вирусами, обычно с ВОМ, на листьях лилии *Lilium longiflorum* наблюдались разного размера вдавленные пятна, иногда вытянутые параллельно жилкам, вначале хлоротичные, а затем серые или коричневые, листья через некоторое время скручивались. Цветки становились карликовыми и крапчатыми. Листья деформировались или полностью не раскрывались. Растения давали мелкую луковицу (Козицкий, 1975).

ВБЛ с трудом передается соком, лучше — в смешанной инфекции с ВОМ. Семенами не передается. Переносится несколькими видами тлей.

К вирусу можно приготовить активную поликлональную антисыворотку.

Вирус распространен во всех странах, где выращивают лилии.

По данным А.В. Крылова (1992), дальневосточный изолят вируса обнаружен в Приморском крае А.Е. Проценко на растениях *Lilium tigrinum* Ker-Gawl., собранных в природе и выращиваемых в Ботаническом саду г. Владивостока. Было показано присутствие в листьях больных растений нитевидных частиц, соответствующих по морфологии и размерам карлавирусам (А. Protsenko, Е. Protsenko, 1962). Был изучен круг растений-хозяев, симптомалогия, физические свойства вирионов, что позволило отнести изолят вируса из лилии к вирусу бессимптомности лилии рода *Carlavirus*.

### М-вирус картофеля *Potato virus M*

Частицы М-вируса картофеля (МВК) имеют размеры  $630-650 \times 11-13$  нм. М.м. РНК вируса — 2,3 мДа. Установлена полная структура генома МВК (Рупасов и др., 1990; Завриев и др., 1991; Zavriev et al., 1991).

Характерной реакцией растений картофеля на заражение МВК является мозаичное закручивание листьев. В отличие от ВСЛК, возбудителя скручивания листьев картофеля, МВК вызывает у растений картофеля только скручивание и волнистость верхних молодых листьев в виде ложечки. При этом одновременно могут развиваться симптомы мозаики. Поэтому болезнь, вызываемую МВК на картофеле, иногда называли «мозаичное закручивание листьев картофеля». Симптомы вирусной инфек-

ции варьиру...  
могут прояв...  
деформации...  
растения. На...  
молодых раст...  
ре (более 24...  
од бутонизац...  
Часто инфек...  
Штаммы...  
мам на расте...  
Круг рас...  
новых. Дурн...  
тизирующая...  
деформирует...  
вых местны...  
местные везд...  
агностическ...  
на зараженн...  
шим тест-рас...  
ными изолят...  
листьев, а не...  
ТТИ в с...  
Эксперим...  
полевых усл...  
ным матери...  
клопами и кл...  
тофеля вирус...  
Снижен...  
ние крахмал...  
Вирус —  
антигенного...  
изолятов, не...

Рис. 98.  
геле — антиген...



ции варьируются в зависимости от сорта, штамма вируса и внешних условий. Они могут проявляться в виде хлоротичной пятнистости листьев, межжилковой мозаики, деформации и морщинистости листьев, задержки роста отдельных побегов и всего растения. На некоторых сортах инфекция имеет латентный характер. Симптомы на молодых растениях на более поздних стадиях развития и при повышенной температуре (более 24 °С) могут маскироваться. Наиболее четко симптомы проявляются в период бутонизации, к концу вегетации они обычно ослабевают или исчезают полностью. Часто инфекция встречается в латентном состоянии или в комплексе с ХВК и СВК.

Штаммы МВК могут различаться по способности передачи тлями и по симптомам на растениях-индикаторах.

Круг растений-хозяев в основном ограничен немногими видами семейства пасленовых. Дурман *D. metel* через 7–14 сут после инокуляции реагирует местными некротизирующими пятнами, позднее пятнистость листьев становится системной, листья деформируются; табак Дебни *N. debneyi* Domin. – образованием коричневых кольцевых местных некрозов; у томата *S. esculentum* на 12–14-е сут появляются местные некротизирующиеся желтые пятна с красновато-фиолетовыми краями. К диагностическому виду можно отнести вигну *Vigna sinensis* сорта Black, реагирующую на заражение МВК красноватыми округлыми некрозами. Хорошим дифференцирующим тест-растением является *Lycopersicon chinense* L., при заражении дальневосточными изолятами М- и S-вирусов картофеля на нем наблюдали сильную деформацию листьев, а нередко и гибель растения (Рейфман и др., 1996).

ТТИ в соке составляет 56–70 °С, ПРС –  $10^2$ – $10^4$ , ПСИ – 2–4 сут.

Экспериментально вирус можно перенести механической инокуляцией сока, в полевых условиях МВК распространяется контактно (во время прививок), посадочным материалом, так как сохраняется в клубнях. Передается он также насекомыми – клопами и картофельной коровкой, неперсистентно тлями *M. persicae*. Семенами картофеля вирус не передается (Рейфман и др., 1996).

Снижение урожайности – на 20–25%. Вирусная инфекция уменьшает содержание крахмала в клубнях на 2–3% (Анисимов, 2004).

Вирус – средний иммуноген (рис. 98). Изоляты МВК различаются по степени антигенного родства, в результате чего антисыворотка, приготовленная к одному из изолятов, не всегда реагирует с другими изолятами вируса.

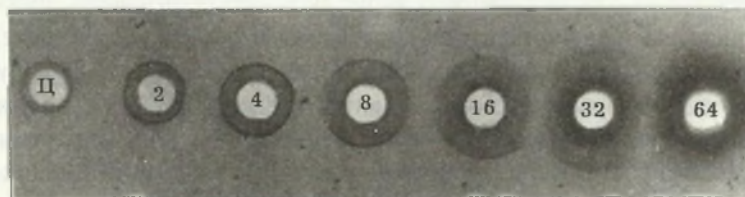


Рис. 98. Реакция МВК со специфическими антителами в РИД. В лунках – разведение Ас, в теле – антиген МВК

Еще одна особенность МВК состоит в том, что существуют «дефектные», т.е. лишенные белка, вирионы. В результате ни один из классических иммунохимических методов не способен выявить вирус в растении.

В клетках растений картофеля, инфицированного МВК, происходит резкое нарушение ультраструктуры хлоропластов. Мембраны органелл разрушаются, включения МВК проникают внутрь хлоропластов, заполняют их строму, в результате граны и ламеллы отодвигаются к противоположной стенке. Образуется большое количество липофильных глобул, что свидетельствует о нарушении липидных процессов и разрушении мембранных белков. Обнаружены специфические для вируса включения. Так, при инфицировании восприимчивых к вирусу сортов картофеля в цитоплазме появляется большое количество пероксисом, в которых видны расположенные параллельно друг к другу вирионы МВК. Включения различной формы и величины концентрируются как в цитоплазме, так и в хлоропластах (Блоцкая, 1989).

Вирус имеет широкое распространение в Дальневосточном регионе России. Заболевание, вызываемое на картофеле МВК, вредоносно и в зависимости от сорта и штамма вируса снижает урожай от 15 до 75% (Романова, 2002).

Распространен во всех странах, где возделывается картофель.

### S-вирус картофеля *Potato virus S*

Частицы S-вируса картофеля (SBK) – нитевидной формы, размером 657×12 нм.

Вирус был впервые выделен в Нидерландах в 1951 г., а позже повсюду, где выращивался картофель (Beemster, De Vokx, 1987). Сейчас считается, что около 10–20% посадок картофеля поражено этим вирусом, причем зачастую вирус встречается в комплексе с другими вирусами (Анисимов, 2004) и влияет на размер клубней, уменьшая их. Иногда в литературе по симптомам заболевания на картофеле SBK называют «кrapчатостью, или обыкновенной мозаикой картофеля». SBK по многим свойствам, в том числе и по симптоматике, очень схож с МВК, поэтому круг поражаемых растений у этих двух вирусов почти один и тот же. SBK поражает растения из семейства Пасленовые и некоторые виды из семейств Маревые и Бобовые. На картофеле (в зависимости от штамма вируса) симптомы выражены от полного отсутствия (латентная форма) до слабой морщинистости и складчатости листьев, их общего посветления. На некоторых сортах картофеля вирус вызывает бронзовость листьев либо их слабую пятнистость и морщинистость (сорта Мажестик, Идеал, Остботе, Фортуна). Некоторые исследователи называют слабопатогенные штаммы SBK вирусом здорового картофеля. При заражении более сильным штаммом SBK–S-1 наблюдают яркую мозаику, krapчатость, общий хлороз, измельчение верхних листьев, отставание растений картофеля в росте. На инокулированных листьях диагностических видов растений, например мари белой, образуются желтоватые местные мелкие поражения, а у паслена *Solanum rostratum* через 20 сут – неправильные темные некротические пятна, которые системно распространяются по растению. В отличие от МВК, на табаке SBK



вызывает системное пожелтение жилок, общий хлороз листьев и межжилковую некротизацию. Для дальневосточных изолятов SBK наилучшие диагностические виды растений – это *N. debneyi*, реагирующий системной реакцией в виде яркой мозаики, и *S. rostratum* Dun. – появляются красноватые некрозы различной величины на инокулированных листьях среднего яруса. На районированных сортах картофеля в ДФО вирусные симптомы чаще всего слабо выражены (слабая мозаика) или вирус присутствует в латентной форме (слабопатогенный штамм).

Вирус – хороший иммуноген, однако иммунохимическими методами выявить его удастся не всегда из-за низкой концентрации вируса в соке растений картофеля.

В цитоплазме клеток SBK образует агрегаты, состоящие из многослойных вирусных частиц. Существенного влияния на ультраструктуру клеточных компонентов вирус не оказывает (Блоцкая, 1989).

Известно несколько штаммов вируса, которые различаются по симптомам на растениях-индикаторах. Дальневосточные штаммы MBK и SBK впервые изучала О.Г. Гордейчук (1972). Штаммы отличались друг от друга по симптомам на картофеле, вирионы имели разные ТТИ, ПРС при выстиавании *in vitro*, по-разному накапливались в тест-растениях и отличались по антигенным свойствам.

ТТИ в соке составляет 55–60 °С, ПРС –  $10^{-2}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – свыше 2–4 сут.

В отличие от MBK, вирус легче передается контактным путем в полевых условиях, распространяется с посадочным материалом, а также насекомыми-переносчиками – тлями, клопами, картофельной коровкой. Возможна передача вируса стеблевыми и клубневыми прививками. Передача его настоящими семенами не отмечена. Резерваторами вируса являются клубни картофеля, в которых он хорошо сохраняется, а также некоторые сорные виды растений (осот полевой, щирица белая, коммелина, ежовник обыкновенный (Романова, Гнутова, 1998).

Вирус распространен во всех районах возделывания картофеля. SBK снижает урожай картофеля до 10–15%. В ДФО встречается повсюду, от юга Приморского края до северной Магаданской области, а также в островных областях – Сахалинской и Камчатской.

#### Оценка антигенной специфичности капсидных белков MBK и SBK и особенности их иммунодиагностики

Оба вируса, как было показано выше, наносят ощутимый вред картофелеводству. В борьбе с вирусными заболеваниями картофеля важна ранняя диагностика вирусной инфекции и своевременный отбор безвирусного посадочного материала. При использовании рутинных методов иммунодиагностики этих вирусов нередко наблюдаются перекрестные реакции. В результате возникает трудность их детекции. Чтобы повысить эффективность массовой диагностики этих вирусов, необходимо решить проблему, связанную с применением высокочувствительного и производительного экспресс-метода диагностики. Для решения этой задачи мы разработали схемы очистки этих вирусов, обеспечивающие сохранение нативности вирусных частиц, получили высо-

коактивные антисыворотки, оптимизировав при этом метод рутинной диагностики этих вирусов.

МВК, выделенный нами из картофеля сорта Пауль Вагнер, накапливали на растениях томатов сорта Хабаровский-308, SBK, полученный из сорта Лорх, — на томатах сорта Невский. Очистку вирусов проводили по методике, предложенной О. Николаевой с соавт. (1985). Концентрацию вируса определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты экстинкции в широком диапазоне от 2,1 до 3,0 (Veerisitty, Brakke, 1978; Thomas, 1980). Выход вируса составил 11–12 мг на 100 г исходной зеленой массы. Электрофорезом в ПААГ в препарате МВК выявлен единственный полипептид с м.м. 37,5 кДа. Очищенный препарат МВК служил иммуногеном при получении поликлональной кроличьей антисыворотки. Вирус вводили подкожно. Разовая доза иммуногена соответствовала 0,5 мг вируса, который смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда. Вторую и третью инъекции проводили внутримышечно. Концентрацию вируса увеличивали до 1 мг. Интервал между инъекциями составлял 7 дней. Кровь у животных брали на 7, 9, 11 и 13-й дни после последней иммунизации. Титры полученных антисывороток определяли в РДД. Использовали 1%-ный агар (Bacto agar, Ferrak, FRG). Для усиления визуального проявления иммунного комплекса в агар добавляли 1,5% ПЭГ. Антиген перед внесением в лунки подвергали действию ультразвука (20 мин, 20кГц) на дезинтеграторе (MSE 150 Watt Ultrasonic desintegrator M-2).

Для определения концентрации вирусов в тест-растениях пользовались РИД. Сравнительный анализ антигенного родства МВК и SBK проводили также при помощи РИД, РИЭФ и ИЭМ. Данные РИД показали, что максимальное накопление МВК в листьях томатов происходит на 18–25-й день от начала инокуляции, а SBK — на 20–30-й день. Метод отличался надежностью и наглядностью. Результаты, полученные нами при определении концентрации карлавирусов в соке больных растений с помощью РИД, свидетельствовали о ценности этого метода для количественного определения вирусов в свежем соке. Обеспечению высокой надежности метода способствовало нахождение оптимального соотношения сыворотки в геле и антигена. В нашем эксперименте разведение сыворотки составило 1:50 (рис. 98).

Очищенные препараты карлавирусов, полученные нами, имели величину соотношения  $A_{260/280} = 1,20-1,25$ . Максимальный выход составил для SBK — 110 мг/кг, МВК — 130 мг/кг. Э. Пролл и Е. Рихтер (Proll, Richter, 1972) из 1 кг зараженных листьев получили 40 мг МВК и 25 мг SBK. Авторы отмечают, что выход обоих вирусов понижался при замораживании исходного материала до  $-15^{\circ}\text{C}$  или при обработке гомогената хлороформом.

О. Николаевой был идентифицирован изолят SBK-P (русский штамм), системно заражающий растения мари *Ch. amaranticolor* Coste et Reyn. При очистке SBK-P из листьев этого растения выход вируса составил 1500 мг/кг (Николаева, 1985). Спектры поглощения УФ-лучей были типичны для нуклеопротеидов с низким содержанием



нуклеиновой кислоты. Максимум достигал 261–265 нм, а минимум – 245–248 нм. Рассеяние света при 260 нм составило 25–30%, а коэффициент специфического поглощения  $A_{260}^{0,1\%} = 2,27$ ,  $A_{260/280}$  для MBK = 1,22–1,23, для SBK = 1,24–1,25.

Очищенные препараты обоих вирусов в 0,005 М боратном буфере, pH 9,0, и в 0,01 М ЭДТА сохраняли инфекционность не менее двух лет. О. Николаева (1985) показала, что причиной утраты природной антигенной специфичности MBK в процессе хранения очищенного препарата является спонтанный ограниченный протеолиз структурного вирусного белка. В отличие от MBK, частичный протеолиз белка оболочки SBK не изменял антигенную специфичность вируса. Протеолиз структурного вирусного белка SBK и MBK полностью устранял при хранении свежeweделенных вирусных препаратов в 0,3 М глициновом буфере, pH 8,2, в присутствии 50% глицерина при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Это обстоятельство, как указывает автор, следует принимать во внимание при хранении вирусных антигенов для получения диагностических антисывороток.

Предварительная оценка КА качества полученных сывороток показала, что изучаемые вирусы являются среднедействующими иммуногенами. Для получения активной антисыворотки достаточно было около 4 мг иммуногена. Способ введения вирусов был п/к, в/м и в/в. Титры антисывороток, по результатам РДД, соответствовали для MBK – 1:1024–1:2048, для SBK – 1:2048. Антисыворотки не содержали антител к нормальным клеточным компонентам здоровых растений.

Е. Рихтер с соавт. (Richter et al., 1979), изучая антигенное родство между MBK и SBK, использовали антисыворотки, приготовленные как к интактным вирусным частицам, так и к белкам оболочки этих вирусов. Диссоциацию белковых оболочек проводили пирролидином. По их данным, между интактными вирусными частицами существует отдаленное антигенное родство, которое обнаруживалось в РДД, в то время как антитела, полученные к белковой оболочке вирусов, с гетерологичными антигенами не взаимодействовали.

Сравнительный анализ антигенных взаимоотношений этих двух картофельных карлавирусов, проведенный с помощью РДД, показал, что при использовании цельных антисывороток полосы преципитации формировались как в гомологичной, так и в гетерологичной системах. Однако при разведении антисывороток 1:8 и выше иммунный комплекс не образовывался с гетерологичными антигенами и наблюдалась только реакция антисыворотки с гомологичным антигеном (MBK или SBK).

Результаты РИЭФ выявили наличие перекрестных реакций между полученными антисыворотками и изучаемыми карлавирусами. В РИЭФ использовали 1%-ный раствор агарозы на 0,075 М минал-цитратном буфере, pH 8,6, содержащем 0,02% азида натрия. Гель смешивали с предварительно подобранным разведением антисыворотки. В лунки вносили по 5 мкл вирусных препаратов (исходная концентрация 1–1,5 мг/мл вируса), а также сок растений, зараженных изучаемыми карлавирусами. РИЭФ проводили в течение 2–5 ч при силе тока 45 мА и напряженности 110 В или 18 ч при 35 мА и 70 В. Антигены перед нанесением в лунки подвергались ультразвуковой дезинтеграции (режим тот же, что и в РДД).



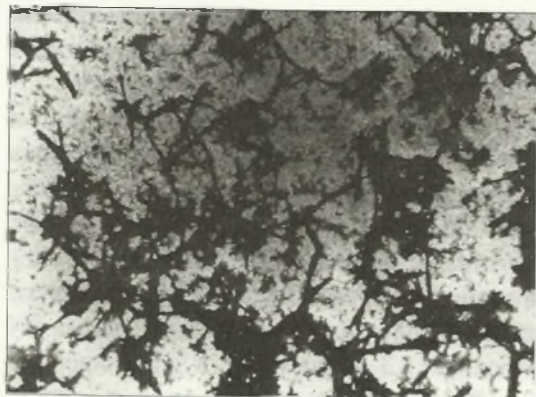


Рис. 99. Декорирование вирионов SBK специфическими антителами методом иммунной электронной микроскопии

Полученные результаты по иммунодиагностики изучаемых карлавирусов показали, что методы РИЭФ и РДД не позволили четко разделять MBK и SBK между собой. Даже при высокой степени очистки вирусного препарата наблюдалась перекрестная реакция капсидных белков, образующихся после протеолиза, что сказывалось на антигенной специфичности MBK и SBK. Только при ИЭМ специфические антитела с гомологичной антисывороткой образовывали иммунный комплекс. Применение этого высокочувствительного и специфичного теста оказалось чрезвычайно полезным для детекции MBK и SBK.

Сравнительный анализ трех вариантов ИФА (прямой, непрямой и сэндвич), по данным О. Николаевой (1985), показал, что в случае использования очищенных препаратов во всех трех модификациях достигается достаточно высокая чувствительность. Однако, как правило, при анализе экстрактов растений компоненты сока мешают на первой стадии сорбции вирусов на поверхности полистирольных плат в прямом и непрямом вариантах ИФА с использованием несенсибилизированных антителами плат. Не были отмечены погрешности при использовании сэндвич-метода ИФА, присущие вышеописанным вариантам ИФА, чувствительность метода была 1–40 нг/мл. Высокая чувствительность и специфичность ИФА весьма важна в семеноводстве картофеля при проведении массовых лабораторных анализов с целью вирусологического контроля MBK и SBK.

В настоящее время в семеноводстве картофеля для диагностики вирусов, в том числе и карлавирусов, успешно используют не только лабораторный метод ИФА, но и высокочувствительные технологии молекулярной диагностики вирусных и вироидных инфекций картофеля (Дрыгин и др., 2007; Завриев и др., 2007; Чирков, 2009). Это – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в сочетании с МГА-ИФА, иммунохроматография на тест-полосках, технология молекулярно-гибридизационного анализа (МГА) в сочетании с ИФА на мембранах (МГА-ИФА).

Однако при использовании метода ИЭМ вирусные частицы MBK и SBK сорбировали на своей поверхности только специфичные антитела (рис. 99). С помощью ИЭМ декорирование вирионов карлавирусов проводили антителами, полученными к обоим вирусам. Разведение сывороток составило: к SBK – 1:50, к MBK – 1:10. При этом отмечали, что частицы SBK покрывались специфическими антителами гораздо лучше, чем MBK. Перекрестных реакций между изучаемыми комплексами антиген-антитело не наблюдали.

Последний  
нобилизова  
этилтриам  
дуплексов  
Метод позво  
чувствитель  
за короткое  
тофель, и  
композитив  
растений  
коллоиднос  
годы предш  
брану, в яче  
вирусов и  
меченной  
выявляют  
Совместно  
MBK, YBK  
ская пирофи

Вирус  
ниях гор  
ком на листь  
нии со свет  
1989 г., раб  
и Хабаров  
тений был  
на растени  
на инокула  
тизация), бо  
вируса (Т  
фицирова  
рые виды  
*lupulina* L.  
*sativum* C  
*graecum* L.  
некоторые  
неинокула  
тость и про  
белая реак



Последний метод основан на гибридизации нуклеиновой кислоты вируса, иммобилизованной на нитроцеллюлозной мембране с кДНК-зондом, меченным хлорид-этилтриамин-платиной (диен-Рт), и последующем выявлении образующихся гетеродуплексов в непрямом варианте ИФА с помощью антител, специфичных к диен-Рт. Метод позволяет выявить до 1 пг вирусной ДНК в 1 мкл образца. В силу его высокой чувствительности, специфичности и возможности анализа большого числа образцов за короткое время он пригоден для массовой диагностики вирусов, поражающих картофель, и других фитовирусов. Разработана технология получения мультимембранных композитов (тест-полосок) для иммунохроматографического определения вирусов растений, основанная на использовании поликлональных антител к вирусам и частиц коллоидного золота в качестве маркера (Бызова и др., 2009). Кроме того, в последние годы предложена ДНК-микроплата, представляющая собой нитроцеллюлозную мембрану, в ячейки которой фиксированы рекомбинантные ДНК, комплементарные РНК вирусов и вириона. Анализ основан на гибридизации нуклеиновой кислоты вируса, меченной диен-Рт, с кДНК, фиксированной в ячейках микроплаты. Гетеродуплексы выявляются в непрямом варианте ИФА с помощью антител, специфичных к диен-Рт. Совместно с ЗАО «НВО Иммунотех» разработаны наборы для ИФА к ХВК, СВК, МВК, УВК, АВК, ВСЛК, где в качестве ферментной метки использована неорганическая пиррофосфатаза *E. coli*.

#### Вирус мозаики горошка ложносочевичного *Vicia pseudorobus* mosaic virus

Вирус мозаики горошка ложносочевичного (ВМГЛ) впервые выявлен на растениях горошка ложносочевичного *Vicia pseudorobus* Fisch. et Mey. С мозаичным рисунком на листьях (очень ярко выраженные белые или светло-желтые пятна в чередовании со светло-зелеными) он был обнаружен в Амурской области в 1977 г., а позже, в 1989 г., растения с подобными симптомами были найдены в природе в Приморском и Хабаровском краях (Костин, 2005). По данным этого автора, в соке больших растений были выявлены нитевидные вирионы. Заболевание передавалось механически на растения: *Ch. amaraticolor* (некрозы), махорка *N. rustica* (кольцевая пятнистость на инокулированных листьях), горох *Pisum sativum* сорта Аляска (системная некротизация), бобы (морщинистая мозаика). Дальнейшее изучение круга растений-хозяев вируса (Толкач и др., 1993) показало, что из 92 видов растений, искусственно им инфицированных, заразились только каян индийский *Cajanus cajan* (L.) Millsp., некоторые виды мари, бобы *F. vulgaris* Moench, лобия *Dolichos lablab* L., люцерна *Medicago lupulina* L., *M. sativa* L., фасоль *Ph. aureus* L., *Ph. vulgaris* sv. Perlicka, горох *Pisum sativum* cv. Alaska, пажитники – голубой и сенной *Trigonella caerulea* Ser., *T. foenum-graecum* L. В качестве тест-растений авторы рекомендовали использовать бобы и некоторые виды мари. Симптомы у бобов появлялись на 7–10-й день – на верхних неинокулированных листьях светлели жилки, затем развивалась хлоротичная крапчатость и происходила деформация базальной части листа. Мари – амаратноцветная и белая реагировали на заражение вирусом некрозами, а у мари квиноа появлялись хло-

ротичные пятна, при этом локальная инфекция могла переходить в системный хлороз и некроз жилок.

Вирус легко передавался тлями *M. persicae*.

ТТИ – 65–70 °С, ПСИ – 1 сут.

Вирионы имели нитевидную форму размером 650 × 11 нм.

Нуклеиновая кислота представлена одной молекулой линейной (+)онРНК, м.м. белка – 34 кДа.

К очищенному препарату была приготовлена антисыворотка с титром в РДД – 1:64 и в непрямом варианте ИФА – 1:3200. Методами иммунохимического анализа были выявлены идентичные эпитопы между М- и S-вирусами картофеля и изучаемым вирусом.

Полученные данные позволили отнести новый вирус к роду *Carlavirus*. Позже он был назван – вирус мозаики горошка ложносочевидного. Первоначальное название, упоминаемое в литературе, – вирус мозаики вики ложночиновой.

### Род *Potexvirus*

Типовой вид рода – X-вирус картофеля *Potato virus X* – дал роду название *Potexvirus*. Род включает 53 вида – немногим более двух десятков общепризнанных видов и более 20 возможных представителей. Потексвирусы присутствовали уже в ранних схемах классификации вирусов растений (Harrison et al., 1971), и в последующие годы род постоянно пополнялся новыми видами, как истинными, так и предполагаемыми.

**Свойства вирионов. Морфология.** Вирионы потексвирусов представляют собой гибкие нити, длина которых варьируется от 470 до 580 нм, а диаметр обычно составляет 11–13 нм (Hammond, Hulls, 1981; Mowat, 1982). Частицы построены из 1400–1500 идентичных белковых субъединиц на один вирион (Erickson, Bancroft, 1978; Bancroft et al., 1980), образующих спиральную структуру (шаг спирали 3,4 нм), содержащую геном вируса.

**Физико-химические и физические свойства.** М.м. вириона составляет 33–36 кДа. (Koenig, Lesemann, 1978; Matthews, 1982). Частицы стабильны,  $S_{20,W}$  – 115–130 S; плавающая плотность в CsCl – 1,31 г/см<sup>3</sup>.

**Нуклеиновая кислота.** Одна молекула линейной (+)онРНК с м.м. 2,1–2,5 мДа представляет 6% массы частицы. Имеет 5'-кеп и 3'-поли(А); длина геномной РНК у разных вирусов от 5845 нт. (вирус мозаики белого клевера *White clover mosaic virus*) до 7015 нт. (вирус желтой мозаики клевера *Clover yellow mosaic virus*). Некоторые потексвирусы инкапсидируют субгеномную мРНК структурного белка.

**Белки.** Один полипептид оболочки с м.м. 18–27 кДа. При хранении очищенного препарата происходит частичный протеолиз белка. Геном ХВК кодирует четыре неструктурных белка: РНК-полимеразу (165 кДа) и три белка (25, 12 и 8 кДа), участвующих в транспорте вируса из клетки в клетку.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

Организм  
транслируется  
полимеразу  
энхансером  
портные белки  
ОРС 5 – белки  
ции субгеномной

Определе  
желтой мозаики  
3'-концевой  
фицированы 5'  
вирусов. Все б  
степенью гомо  
сходство отмеч  
желтой мозаики  
тексвирусов, 3'  
несколько боле  
есть, кроме нор  
разовываться и

Антигены  
ли предметом  
антигенное род

Типичные  
пятнистости  
вера, вирус моз  
*mottle virus*, ви  
*mosaic virus* и д  
воротками к се  
новлено, что в  
нарцисса облас  
ХВК, ВКПГ, В  
кактуса *Zygocis*  
а вирус мозаики  
1980). Использо  
установить общ  
вирусом мозаики  
мозаики цимб  
белков. Но для  
маниока *Cassia*  
ника *Plantain*  
жительных ре  
Niblett, 1977; В



**Организация и репликация генома.** Геномная РНК ХВК непосредственно транслируется как моноцитронная, образуя продукт 5'-проксимального гена – РНК-полимеразу (150–181 кДа), 5'-нетранслируемый лидерный участок (83 нт.) является энхансером трансляции. Последующие перекрывающиеся ОРС 2–4 кодируют транспортные белки 25, 12 и 7 кДа (продукты тройного блока гена), а 3'-проксимальная ОРС 5 – белок оболочки. ОРС 2–5 экспрессируются посредством синтеза и трансляции субгеномных РНК.

Определена полная последовательность нуклеотидов в геномной РНК вируса желтой мозаики клевера. Полная длина геномной РНК вируса – 7015 нт., не считая 3'-концевой поли(А)-последовательности. В составе геномной РНК вируса идентифицированы 5 ОРС, которые характерны для геномов всех секвенированных потексвирусов. Все белки, кодируемые РНК вируса, характеризовались довольно высокой степенью гомологии с аналогичными белками других потексвирусов, но наибольшее сходство отмечалось с белками вируса мозаики папайи *Papaya mosaic virus*. У вируса желтой мозаики клевера *Trifolium yellow mosaic virus*, как и у некоторых других потексвирусов, 3'-концевой цистрон белка оболочки с м.м. 23 кДа располагался внутри несколько более длинной ОРС (28 кДа), находящейся в той же фазе считывания. То есть, кроме нормального белка оболочки у вируса желтой мозаики клевера может образовываться и удлиненный с N-конца вариант капсидного белка (Sit et al., 1990).

**Антигенные свойства.** Потексвирусы, являясь хорошими иммуногенами, стали предметом довольно интенсивных иммунохимических исследований, показавших антигенное родство между многими вирусами этого рода.

Типичные представители рода потексвирусов: ХВК, ВМБК, вирус кольцевой пятнистости гортензии, X-вирус кактуса *Cactus virus X*, вирус желтой мозаики клевера, вирус мозаики нарцисса *Narcissus mosaic virus*, вирус крапчатости фиалки *Viola mottle virus*, вирусы мозаики пепино *Pepino mosaic virus* и мозаики папайи *Papaya mosaic virus* и др. Большинство из них реагируют в перекрестных реакциях с антисыворотками к одному или нескольким видам рода (Costa, Kitajima, 1971). В РДД установлено, что вирусы мозаики кофейного дерева *Negro coffee mosaic virus* и мозаики нарцисса обладают слабым антигенным родством с вирусом желтой мозаики клевера, ХВК, ВКПГ, ВМБК и тремя штаммами X-вируса кактуса (Koenig, 1975). Вирус зигокактуса *Zygocactus virus* родственен с X-вирусом кактуса и ХВК (Giri, Chessin, 1975), а вирус мозаики пепино – с вирусом мозаики нарцисса и X-вирусом кактуса (Jones, 1980). Использование ИФА (непрямой вариант) позволило Р. Кениг (Koenig, 1981) установить общие антигенные детерминанты у вируса мозаики цимбидиума и ХВК с вирусом мозаики пепино, а у X-вируса кактуса и вируса мозаики нарцисса с вирусом мозаики цимбидиума, которые до этого не выявляли антигенного родства капсидных белков. Но для некоторых типичных потексвирусов – вируса обыкновенной мозаики маниока *Cassava common mosaic virus*, X-вируса кактуса, вируса мозаики подорожника *Plantanium mosaic virus*, вируса мозаики лисохвоста *Fuxtall mosaic virus* – положительных реакций в перекрестных иммунохимических тестах не получено (Paulsen, Niblett, 1977; Hammond, Hull, 1981). Для возможных членов рода потексвирусов в



подавляющем большинстве не обнаружено антигенное родство ни с типичными, ни с другими истинными членами потексвирусов.

**Биологические свойства.** Потексвирусы поражают узкий круг растений, вызывая чаще всего мозаику и хлоротичную крапчатость листьев. Иногда встречаются и такие симптомы, как обычная и кольцевая пятнистость (вирус кольцевой пятнистости гортензии *Hydrangea ringspot virus*), посветление жилок, деформация листьев, задержка роста стебля (вирус кустистой карликовости артишока *Artishoke curly dwarf virus*). Для некоторых вирусов – мозаики белого клевера, аукуба мозаики картофеля, крапчатости фиалки, мозаики пепино – характерна на растениях бессимптомная инфекция (Bercks, Brandes, 1961; Bercks, 1971; Kassanis, Govier, 1972; Jones et al., 1980). На растениях картофеля вирус вызывает различные формы мозаики и крапчатости. Светло-зеленые пятна на листьях иногда трудно увидеть в солнечный день. Слабые симптомы лучше всего заметны на молодых растениях до цветения. Затем они ослабевают или исчезают. Симптомы зависят от штамма, сорта картофеля и погодных условий. Известны как мозаичные (слабопатогенные) штаммы, так и некротические штаммы (сильнопатогенные), вызывающие некрозы на листьях, верхушках стеблей и клубнях. У картофеля при инфицировании ХВК также наблюдается как латентная форма инфекции, так и гиперчувствительная реакция. Некоторые штаммы ХВК имеют незначительную вредоносность, до 10–15%, поэтому эти штаммы ХВК иногда называют «вирусом здорового картофеля». Некротические штаммы способны снижать урожай до 50%, а мозаичные – до 20%. Как правило, ХВК встречается в комплексной инфекции с АВК и УВК. Смешанная инфекция наиболее опасна и может вызывать гибель растения.

Потексвирусы высоко инфекционны, температура их инактивации находится в пределах от 60 до 80 °С, инфекционность сохраняется при разведении сока до  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ .

Вирусы легко передаются механической инокуляцией и при контакте растений, переносчики не известны.

Потексвирусы этого рода широко распространены в мире.

### Вирус кольцевой пятнистости гортензии *Hydrangea ringspot virus*

Вирус впервые описан в 1954 году (Brierley, 1954). Естественным растением-хозяином вируса кольцевой пятнистости гортензии (ВКПГ) является только гортензия крупнолистная, хотя вирус может заражать более 20 видов растений из 12 семейств. Правда, *Primula malacoides* (Holling, 1958; цит по: Koenig, 1973) иногда реагирует системно на заражение вирусом, но чаще без видимых симптомов. ВКПГ проявляется на зараженных растениях гортензии в виде хлоротичных и коричневых колец. Диагностические виды: гомфрена головчатая *G. globosa* – лучшее из всех тест-растений, реагирующая локальными некрозами на 3–4-й день после инокуляции; умарей *Ch. quinoa* и *Ch. amaranticolor* появляются локальные хлоротические пятна на

5–7-й день  
лучении от  
ТТИ  
1973).

На юге  
*macrophylla*  
симптомы в  
блюдали, что  
кольцевая п  
стья чаще и  
растения не  
носителем  
русом. Икс  
темно-красн  
листьях обра  
позже некро

На 3-м  
дальневосточ  
с м.м. 2,1 м  
Установле  
при комнатн  
она резко сни  
ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$   
телей (Билан)

При прок  
ружены ните  
ВКПГ  
явлена. Пере



5–7-й день; *Primula malacoides* можно использовать для накопления вируса при получении очищенного препарата.

ТТИ – 70–75 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 2–3 нед (Holling, 1958; цит по: Koenig, 1973).

На юге ДВ России ВКПГ идентифицирован на растениях гортензии *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) DC (Чуян и др., 1975). На листьях гортензии вирус вызывает симптомы в виде хлоротичных колец, полуколец и пятен. В ходе исследований наблюдали, что наиболее четко симптомы проявлялись на старых листьях – слабая кольцевая пятнистость, иногда приобретающая красноватый оттенок, молодые листья чаще имели нормальную зеленую окраску. По размерам и развитию пораженные растения не отличались от здоровых. Круг экспериментальных растений-хозяев относительно узок. Из 12 видов растений только три прореагировали на заражение вирусом. Ими оказались *G. globosa* (на 6-й день на листьях появлялись серые некрозы с темно-красным окаймлением), *Ch. amaranticolor* (через неделю после инокуляции на листьях образовывались мелкие некротические пятна менее 1 мм в диаметре, которые позже некротизировались) и *Celosia argentea* L. (локальные некрозы).

На 3'-конце РНК выявлены поли(А)-последовательности. В состав вирионов дальневосточного изолята ВКПГ входит одноцепочечная нефрагментированная РНК с м.м. 2,1 мДа и только 1 полипептид с м.м. 25,8 кДа (Артюкова, 1985).

Установлено, что при выдерживании сока инфицированных вирусом растений при комнатной температуре в течение 21 сут ВКПГ сохранял инфекционность, хотя она резко снижалась. По данным А.Х. Чуян с соавт. (1975), ВКПГ имел ТТИ 72–73 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 2 сут, что согласовывалось с результатами других исследователей (Билай и др., 1988; Holling, 1958; цит по: Koenig, 1973).

При просмотре препаратов, содержащих ВКПГ, в электронном микроскопе обнаружены нитевидные частицы с модалными размерами  $500 \times 12$  нм (рис. 100).

ВКПГ передавался механически инокуляцией сока. Семенная передача не выявлена. Переносчики не известны.

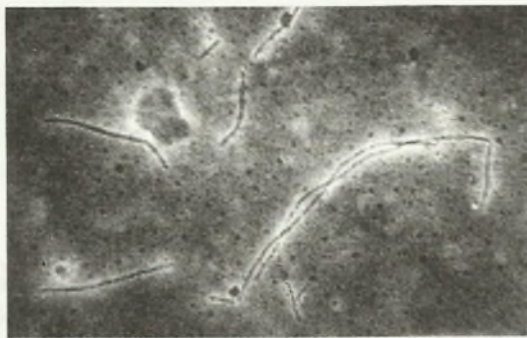


Рис. 100. Электронная микрофотография вирионов вируса кольцевой пятнистости гортензии

Для накопления вируса с целью получения очищенного препарата, по литературным данным, наиболее часто использовали растение петунью *Petunia malacoides* (Koenig, 1973), мы – гортензию крупнолистную, так как отмечали в осенне-зимний период в ее соке высокую концентрацию вируса и локальные некрозы гоμφрены шаровидной. Сравнивали несколько методик очистки вируса (Belli, 1967; Koenig, 1973; Hill, Benner, 1977). Наиболее подходящая для изучаемого изолята ВКПГ оказалась следующая: гомогенизация растительного материала в 0,5 М боратном буфере, pH 7,8 ( $v/v = 1/3$ ), с добавлением 0,1% аскорбиновой кислоты и 0,1% NaCl; центрифугирование гомогената (5–4000  $g \times 10$  мин); осветление супернатанта хлороформом ( $v/v = 1/7$ ) и 8% буганола, встряхивание 10 мин и центрифугирование (6–5000  $g \times 30$  мин); осаждение вируса 4%-ным ПЭГ (м.м. 6000) с 0,3 М NaCl, отстаивание жидкости 2 ч и центрифугирование (12–11000  $g \times 20$ –25 мин); ресуспендирование в течение 1 ч осадков в 0,2 М боратном буфере, pH 8,0, содержащем 0,5 М мочевины и 0,1% 2-меркаптоэтанола, и центрифугирование (8–7000  $g \times 15$  мин); дважды экстрагирование осадков в 0,2 М боратном буфере, pH 8,0, содержащем 0,5 М мочевины и 0,1% 2-меркаптоэтанола, и затем 2–3 цикла дифференциального центрифугирования вирусной суспензии (40–36000  $g \times 90$  мин, 4–3000  $g \times 10$  мин).

Препарат вируса имел типичный спектр поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 260 нм и минимумом при 240–245 нм.

Соотношение величин оптических плотностей при 260 и 280 нм ( $A_{260/280}$ ) и спектра поглощения, скорректированного по светорассеиванию  $E_{260}^{0,1\%}$  для вируса = 3,08 (Koenig, 1973). Выход вируса составлял 60–80 мг/кг зеленой массы.

Введение животным вируса в/м в сочетании с в/к и п/к инъекциями (1 мг при 3-кратном введении антигена с адьювантом) позволило нам получить поликлональную кроличью антисыворотку с титрами специфических антител – 1:512–1:2048 (КА), 1:32–1:128 (РДД), 1:12800 (непрямой вариант ИФА).

ВКПГ является хорошим иммуногеном. Вирус со специфической антисывороткой формирует плотные хлопьевидные преципитаты в пробирках и в реакции капельной агглютинации. Наибольший процент идентичных эпитопов (47,85%) отмечен у ВКПГ с ВМБК, по результатам конкурентного варианта ИФА он также имеет антигенное родство с ХВК (20,9%) и ВАМК (24%).

Вирус обнаружен во многих странах Европы, в США, Новой Зеландии.

### Вирус мозаики подорожника азиатского *Plantago asiatica mosaic virus*

Вирус, вызывающий мозаичное заболевание подорожника азиатского, был первоначально обнаружен на Сахалине в 1968 г. В.Д. Костиным, а позже, в 1971–1972 гг., – в Приморском крае В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

Вирус вызывающий мозаичное заболевание подорожника азиатского, был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

Экспериментально установлено, что вирус вызывает мозаичное заболевание подорожника азиатского. Вирус был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

Вирус мозаики подорожника азиатского был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

В природе вирус мозаики подорожника азиатского был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

ТТИ при температуре 100°C в течение 30 мин.

Вирус мозаики подорожника азиатского был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

По данным В.Д. Костина и Ю.Г. Волкова (1976) вирус мозаики подорожника азиатского имеет морфологию, близкую к вирусам мозаики подорожника европейского и морского изолята.

Было показано, что вирус мозаики подорожника азиатского был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).

Была выявлена вирусная РНК – 2 мДа.

М.м. белков – 30–40 кДа.

На основании полученных данных предполагается, что вирус мозаики подорожника азиатского был обнаружен в Приморском крае в 1971–1972 гг. В.Д. Костиным и Ю.Г. Волковым (1976). Они изучили биологические свойства нового для бывшего СССР вируса, а физико-химические – Л.А. Минская (1980).



Вирус вызывал у подорожника симптомы ярко выраженной мозаики, часто сопровождающейся морщинистостью или гофрированностью листа. На молодых отрастающих листьях светло-зеленые пятна часто располагались вдоль жилок, примыкая непосредственно к ним и создавая впечатление жилковой мозаики. На старых листьях наблюдали иногда некротизацию с образованием коричневых пятен.

Экспериментально вирусом поражались растения семейств *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* и *Polygonaceae*. Из 75 исследованных видов, относящихся к 22 семействам, было выявлено 24 поражающихся вида из 12 семейств. Позже было показано, что хозяевами приморского изолята ВМПА могут быть 87 видов растений из 238 исследованных, а сахалинского – 59 из 139 (Волков, Костин, 1981). Растением, надежно реагирующим на заражение вирусом, была *G. globosa* (четкие некрозы с малиновым ободком образовывались на листьях уже на 3–4-й день, что делало его удобным для исследований вируса тест-растением). При инокулировании вирусом изолированных листьев этого растения также получали четкие некрозы.

Вирус может передаваться, по данным этих авторов, на культивируемые растения – свеклу, томаты, фацелию, гречиху, циннию, флоксы, сальвию. Среди дикорастущих видов встречались представители местной флоры без внешних признаков заболевания, которые могут служить природными вирусносителями.

В природе вирус распространен в самой южной части острова Сахалин и на юге Приморского края. В очагах заболевания помимо подорожника выявлены и другие виды растений-вирусносителей: на Сахалине – клевер полевой *Tr. pratense*, в Приморье – дурнишник сибирский *Xanthium sibiricum* Partin ex Wild. и спорыш птичий *Polygonum aviculare* L. При этом у последних двух видов отмечено латентное вирусносительство.

ТТИ приморского изолята – 59 °С, сахалинского – 65 °С, ПСИ приморского изолята – от 3 до 5 сут, сахалинского – до 18 сут, ПРС – 10<sup>-3</sup>.

Вирус легко передавался механической инокуляцией, поэтому первооткрыватели вируса считают, что его можно перенести и на подошвах обуви. Не отмечена семенная передача, персиковой тлей и через почву.

По данным Л.А. Минской с соавт. (1977), вирус имел нитевидную форму вирионов длиной, в зависимости от штамма, 490 нм (сахалинский изолят) или 530 нм (приморский изолят) и шириной 11 нм.

Был получен очищенный препарат вируса. Соотношение  $A_{260/280} = 1,4$ , что соответствовало значению и для других потексвирусов. Частицы стабильны,  $S_{20, w} = 108$ –118 S для сахалинского изолята и 106–113 S для приморского.

Была выделена одноцепочечная РНК, коэффициент седиментации 29–30 S. М.м РНК – 2 мДа.

М.м. белка 21–22 кДа. По аминокислотному составу вирус был близок к белкам других потексвирусов (Минская и др., 1977; Минская, 1980).

На основании полученных данных по морфологии вирионов, биологическим и физико-химическим свойствам двух изолятов вируса В.Д. Костин с сотрудниками предположили, что вирус относится к роду *Potexvirus*.

Для дальнейшей идентификации были изучены иммуногенные и антигенные свойства вируса. Была получена антисыворотка к приморскому изоляту. Вирус оказался сильным иммуногеном и обладал высокой антигенной активностью, что характерно для многих потексвирусов. С помощью этой антисыворотки вирус был обнаружен на подорожнике в биоценозах острова Сахалин в двух местах: в Долинском районе и пос. Новоалександровск. Сахалинские изоляты ВМПА несколько отличались от приморского по характеру симптомов на некоторых тест-растениях. Была получена антисыворотка к сахалинским изолятам (иммуногеном служила смесь долинского и новоалександровского изолятов). Применяли ту же схему иммунизации, что использовали для получения антисыворотки к приморскому изоляту вируса. Антиген вводили в/м и в/в по следующей схеме: 1-й день – 1 мг в/в; 2-й – 2 мг в/в, 3-й – 4 мг (в/м), 6-й – 4,5 мг (в/м), 7-й – 5,0 мг (в/м) и 9-й – 6 мг (в/в). Антиген смешивали с полным адьювантом Фрейнда.

Титры антисывороток по результатам реакции КА были относительно высокими – 1:1024–1:8192. Для определения титра специфических антител в РДД вирус обрабатывали ультразвуком с целью лучшего прохождения через поры агара. Антисыворотка к приморскому изоляту ВМПА была на два порядка активнее, чем к сахалинскому. Последний не реагировал с приморским в РДД, в то время как приморский изолят реагировал с антителами к сахалинскому изоляту, что указывало на эпитопы капсидных белков как свои индивидуальные, так и видоспецифические.

Изучаемые изоляты ВМПА в РДД показали антигенное родство с ХВК, однако процент идентичных эпитопов был невысокий, но ВМБК не реагировал с изолятами ВМПА.

Таким образом, по морфологии вирионов, физико-химическим, антигенным и биологическим свойствам вирус мозаики подорожника азиатского был отнесен к возможным членам рода потексвирусы. Он вошел в список вирусов, который опубликовал МКТВ.

### Вирус аукуба мозаики картофеля *Potato aucuba mosaic virus*

Вирионы вируса аукуба мозаики картофеля (ВАМК) представляют собой нитевидные частицы размером 580–594 × 11 нм (Рейфман и др., 1971). Вирус имеет несколько синонимов, которые до сих пор встречаются в научной литературе. Раньше в бывшем СССР этот вирус чаще назывался F-вирусом картофеля, а за рубежом и некоторыми нашими исследователями по симптомам на картофеле – вирусом аукуба мозаики картофеля *Potato aucuba mosaic virus*, иногда – (желтая) аукуба мозаики картофеля.

Вирус имел невысокий процент распространения на картофеле, поэтому долгое время не вызывал большого интереса у исследователей, оставаясь мало изученным. До 1995 г. из-за недостающих критериев идентификации его относили к возможным представителям рода *Potexvirus*. Дальневосточные фитовирусологи внесли свой су-

щественный вклад, что позволило представить

Коэффициент плавающей плазмы составляет 2,2. Коэффициент с м.м. 2,2. Случайного его. Тидных ком. 3'-конце выв.

Характеристиках. В зависимости от разных сил. листьев, сетчатой вильной формы. являются в виде инфекции.

Кругом. тем не менее. цевых, бобовых. мы в виде *demissum* р. крозами, пас. характерно. заражение. после иноку. а позже на. листья опали. товатой моз.

Вирус. Перенос. *nasturcii*, А.

ТТИ – 6. лась 3–4 дня.

Известно. растениях, или G-вируса.

По нашим данным, сообщ.

Максимум. день после. дурмана пров. Oshima, 1972. pH 7,5, с доб.



ществленный вклад, изучая свойства вируса, и в 80–90-е гг. прошлого столетия доказали, что по своим характеристикам его следует считать не возможным, а истинным представителем рода *Potexvirus*.

Коэффициент седиментации  $S_{20,W}^0$  в зависимости от рН буфера, был 115–130 S; плавучая плотность в CsCl – 1,31 г/см<sup>3</sup>. По данным электрофореза в ПААГ, м.м. РНК составляет 2,5 мДа (Артюкова и др., 1987). ВАМК содержит один белковый компонент с м.м. 27,4 кДа. Обнаружена гетерогенность капсидного белка вируса из-за частичного его протеолиза во время хранения и очистки. Выявлено от 1 до 3 полипептидных компонентов с м.м. 27,6; 24,1; 21,6 кДа (Сапоцкий, 1980; Артюкова, 1985). На 3'-конце выявлены поли(А)-последовательности (Морозов и др., 1983).

Характерным симптомом на картофеле является ярко-желтая крапчатость на листьях. В зависимости от изолята, сорта картофеля и внешних условий ВАМК вызывает разные симптомы на растениях – некроз верхушек, желтую пятнистость и мозаику листьев, сетчатый некроз в паренхиме коры и сердцевине мякоти клубней в виде правильной формы пятен, позднее имеющих вид сухих бурых углублений, которые проявляются в период их хранения (не у всех сортов). Широко распространена латентная инфекция вируса.

Круг растений-хозяев в основном ограничен видами из семейства пасленовых, тем не менее к вирусу восприимчивы и отдельные виды растений из семейств широчевых, бобовых, маревых и др. Вирус вызывал на растениях дурмана *D. metel* симптомы в виде серых концентрических некрозов на инокулированных листьях; *Solanum demissum* реагирует на инфицирование вирусом кольцевыми темно-коричневыми некрозами, паслен *S. miniatum* Bernh. – на 10-й день яркой мозаикой, для *D. stramonium* характерно бессимптомное носительство, у табака *N. tabacum* cv. Samsun в ответ на заражение вирусом развивалась пятнистая мозаика. На растениях *Capsicum annuum* после инокуляции вирусом сначала на зараженных листьях образовывались некрозы, а позже на остальных появлялись некрозы в виде колец и полуколец, со временем листья опадали, иногда растение гибло. *N. glutinosa* на заражение отвечала яркой желтоватой мозаикой.

Вирус передается контактно, прививкой, сохраняется в клубнях.

Переносчиками вируса в природе являются тли видов *Myzus persicae*, *Aphis nasturcii*, *Aulacorthum circumplexus*, *A. solani*, передающие вирус неперсистентно.

ТТИ – 65–70 °С, при комнатной температуре инфекционность ВАМК сохранялась 3–4 дня, ПРС – 10<sup>-4</sup>–10<sup>-5</sup>.

Известны штаммы ВАМК, значительно различающиеся по симптомам на тест-растениях, некоторые из этих штаммов ранее имели название – F-вирус картофеля, или G-вирус.

По нашим данным, вредоносность не значительна, в то же время есть другие данные, сообщающие о потере урожая картофеля от 30 до 40% (Анисимов, 2004).

Максимальная концентрация вируса в растениях дурмана отмечена на 12–14-й день после инокуляции. Очистку вируса из зараженных свежесорванных листьев дурмана проводили по модифицированной методике японских исследователей (Miki, Oshima, 1972). Растительный материал гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере, рН 7,5, с добавлением 0,5 М NaCl и 0,1%-ного 2-меркаптоэтанола. Экстракт осветля-

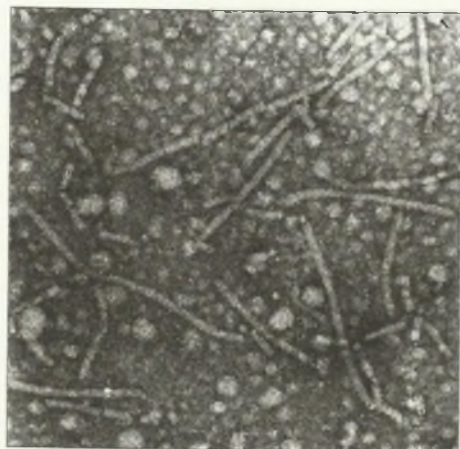


Рис. 101. Электронная микрофотография вирионов ВАМК

280 нм ( $A_{260/280}$ ) и спектра поглощения, скорректированного при светорассеивании, было 1,2–1,25. Коэффициент экстинкции  $E_{260}^{0,1\%} = 2,6$  (Kassanis, Govier, 1972). Выход вируса составил 60–70 мг/кг.

Отмечена высокая антигенная активность капсидных белков. Вирус легко определялся различными иммунохимическими методами, в том числе и иммунной электронной микроскопией (рис. 101).

ВАМК – активный иммуноген. Любой способ введения кроликам не менее 3 мг вируса (3-кратно с недельным интервалом) с адьювантом позволял получить высокоактивную антисыворотку с титрами специфических антител – 1:1024–1:2048 (КА), 1:8–1:32 (РДД), 1:3200 (непрямой вариант ИФА) (рис. 102).

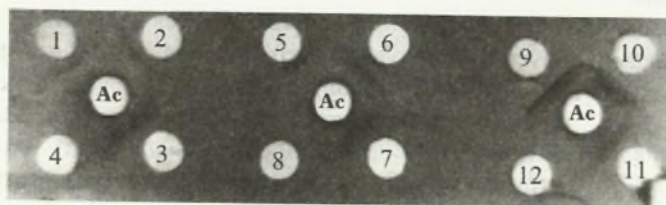


Рис. 102. Реакция специфических антител с ВАМК в РДД. В центральных лунках – Ас к ВАМК, по периферии – 4, 8, 12 – сок здорового растения, в остальных лунках – вирусные препараты

Наибольший процент (68,07%) идентичных родоспецифических эпитопов по результатам конкурентного варианта ИФА отмечен с ХВК, меньше – с ВМБК (28,8 %) и с ВКПГ (24,5%).

Итак, полученные результаты позволяют с полной уверенностью считать ВАМК не возможным представителем рода *Potexvirus*, а истинным членом этого рода.

ли хлороформом (v/v = 1/7) и 8%-ным бутанолом, смесь встряхивали 15 мин, после чего центрифугировали (6000 g × 20 мин). Вирус осаждали 4%-ным ПЭГ с 0,3 М NaCl. Жидкость отстаивали 1 ч, после чего центрифугировали (6000 g × 20 мин). Осадки экстрагировали в 0,02 М боратном буфере, рН 7,6–7,8, с добавлением 0,03%-ного NaN<sub>3</sub> в течение 1–2 ч и центрифугировали (10–12000 g × 15 мин). Экстракцию проводили 2–3 раза. Конечный этап – 2–3 цикла дифференциального центрифугирования супернатанта (40000 g × 90 мин, 5000 g × 10 мин).

Препарат вируса имел типичный спектр поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 260–265 нм и минимумом при 245–247 нм. Соотношение величин оптических плотностей при 260 и

280 нм ( $A_{260/280}$ ) и спектра поглощения, скорректированного при светорассеивании, было 1,2–1,25. Коэффициент экстинкции  $E_{260}^{0,1\%} = 2,6$  (Kassanis, Govier, 1972). Выход вируса составил 60–70 мг/кг.

Отмечена высокая антигенная активность капсидных белков. Вирус легко определялся различными иммунохимическими методами, в том числе и иммунной электронной микроскопией (рис. 101).

ВАМК – активный иммуноген. Любой способ введения кроликам не менее 3 мг вируса (3-кратно с недельным интервалом) с адьювантом позволял получить высокоактивную антисыворотку с титрами специфических антител – 1:1024–1:2048 (КА), 1:8–1:32 (РДД), 1:3200 (непрямой вариант ИФА) (рис. 102).

Вирус  
× 11 нм (рис.  
ящим из 3-х  
последователь

Этот ви  
чатая или ме  
ращивание в  
которые тру  
молодых ра  
нии сильно  
симптомы о  
стеблей либ  
ниях в высо  
Известно де  
ции. Подве  
ной части т  
жая здоров  
может быть

Круг ра  
240 видов  
*D. stramonii*  
и *G. globosa*  
Из культуры  
культуры т  
ственных ра  
зантемы (сл  
деформиров  
гибридной  
ки, слегка за  
белены черн  
с желтой ар  
следних ХВ  
с ВТМ (Чун  
показали, ч  
этих изоля  
физическое  
пичные для

Отмеча  
нообразие  
количество



Х-вирус картофеля *Potato virus X*

Вирионы Х-вируса картофеля (ХВК) – нитевидные частицы размером  $470\text{--}600 \times 11$  нм (рис. 103), представлены одноцепочечной РНК с м.м. 2,1 мДа и белком, состоящим из 3-х компонентов с м.м. 29; 26; 23 кДа. На 3'-конце РНК выявлены поли(А)-последовательности.

Этот вирус вызывает на растениях картофеля болезнь, которую называют «крапчатая или мягкая мозаика картофеля». В зависимости от штамма, сорта и условий выращивания картофеля вирус вызывает расплывчатые светло-зеленые пятна на листьях, которые трудно рассмотреть в солнечный день. Слабые симптомы лучше заметны на молодых растениях до цветения, затем они ослабевают или исчезают. При поражении сильнопатогенными штаммами ХВК на растениях отдельных сортов отмечаются симптомы от сильной до слабой крапчатости листьев, некроз на листьях и верхушках стеблей либо отсутствие внешних симптомов, хотя ХВК накапливается в таких растениях в высокой концентрации. При этом снижение урожая картофеля существенное. Известно довольно много сортов картофеля – носителей латентной вирусной инфекции. Подтверждение этому – наши наблюдения за районированными сортами в южной части полуострова Камчатка, причем продуктивность их мало отличалась от урожая здоровых растений. Снижение урожая картофеля даже при отсутствии симптомов может быть до 15%, при мозаичном поражении – до 25% (Анисимов, 2004).

Круг растений-хозяев вируса широк. ХВК заражает, по крайней мере, растения 240 видов из 16 семейств. Наиболее четко реагируют на инфицирование вирусом *D. stramonium* (на 8–10-е сут системное поражение, иногда наблюдаются некрозы) и *G. globosa* (на 6–10-е сут серо-коричневые некрозы с малиновым окаймлением). Из культивируемых растений в ДВР вирус поражает, помимо картофеля, овощные культуры томаты и перцы. Присутствие вируса выявлено у декоративных и лекарственных растений. На юге Приморского края ХВК был выявлен на растениях хризантемы (слабая крапчатость и слегка деформированные листья), петунии гибридной махровой формы (мозаики, слегка загнутые книзу листьями) и белены черной (морщинистые листья с желтой крапчатостью). У двух последних ХВК присутствовал в смеси с ВТМ (Чуян и др., 1974). Результаты показали, что круг растений-хозяев этих изолятов ХВК, морфология и физические свойства вирионов – типичные для этого потексвируса.

Отмечено большое видовое разнообразие вируса, выявлено большое количество штаммов и изолятов, отли-

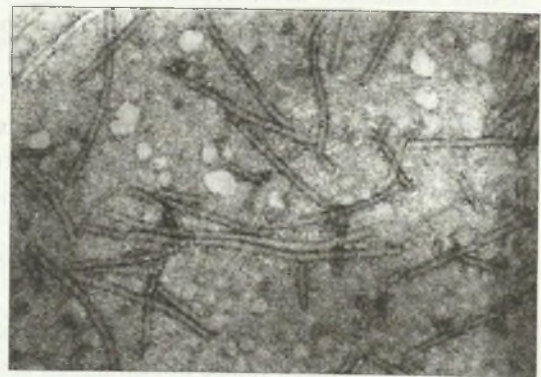


Рис. 103. Электронная микрофотография вирионов Х-вируса картофеля



чающихся друг от друга своей вирулентностью, характером симптомов на определенных сортах картофеля и тест-растениях. Ранее исследован штаммовый состав ХВК (Шелудько, 1977; Романова и др., 1978). Выделено несколько групп штаммов ХВК, но наиболее распространенные входят в состав трех групп – слабо-, сильно- и среднепатогенные. Дальневосточный сильнопатогенный штамм ХВК, названный *таежным*, на листьях растений табака, дурмана, физалисе, петунии, перца и др. вызывал сначала концентрические кольца, которые через 4–5 сут некротизировались, сливались, лист деформировался и отмирал. На отрастающих листьях появлялась некротическая мозаика. Растения нередко погибали. На растениях картофеля различных сортов таежный штамм ХВК вызывал яркую мозаику, некротизацию и деформацию листьев. Растения отставали в росте. Снижение урожая картофеля – от 19 до 50% (Романова, Рейфман, 1981). По данным этих авторов, обычный (среднепатогенный) штамм ХВК проявлялся на листьях в виде обыкновенной мозаичной пятнистости. Обычно в растениях картофеля ХВК присутствует в смеси с другими вирусами, чаще всего это УВК, МВК и др., что способствует снижению урожая картофеля.

Штаммам ХВК свойственна перекрестная защита. Принцип ее состоит в том, что если растение заражается вначале слабым штаммом, то это служит препятствием для размножения родственного вируса или штамма. Таким образом, слабопатогенные штаммы ХВК предохраняют растение от заражения сильнопатогенными. Это явление интерференции, основанное на антогонизме между штаммами вируса, было предложено использовать на практике дальневосточными исследователями. В.Г. Рейфманом и С.А. Романовой был выделен слабопатогенный штамм ХВК, названный ими уссурийским, который был использован ими для вакцинации картофеля против сильнопатогенного штамма (таежного).

ТТИ обычного штамма ХВК в соке (при 10 мин экспозиции) – 60–74 °С в зависимости от штамма, известны случаи сохранения активности даже при 80 °С. Вирус в соке из листьев зараженных растений при комнатной температуре длительное время сохраняет инфекционность – от нескольких недель до года. ХВК накапливается в растениях в высокой концентрации и выдерживает разведение до  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  (Рейфман и др., 1971). Удавалось заразить растения дурмана *D. stramonium* соком, разведенным до  $10^{-9}$  (Гольдин, Крылов, 1966).

В клетках инфицированного растения ХВК образует внутриклеточные включения, наиболее характерными из которых являются мембранные включения своеобразной морфологии (Билай и др., 1988). В клетках растений вирус локализуется в цитоплазме. А.В. Реуновым изучены особенности локализации штаммов ХВК, им выявлены пакеты нитевидных структур, состоящие из нитей. В зависимости от устойчивости сорта картофеля и штамма вируса изменяется и характер внутриклеточного развития ХВК (Реунов, 1999).

Вирус легко передается от растения к растению при их механическом контакте и обработке посевов, а также инокуляцией сока. Он сохраняется в большой концентрации в клубнях картофеля и распространяется посадочным материалом. Достоверных данных о переносчиках ХВК нет, однако имеются сведения о передаче вируса путем

контакта корня  
Власов, Само  
былками из р  
семена (Бло  
личинками зар

Распросто

В высоко  
день после  
ном буфере, р  
смесью хлоро  
тракту 4–5%  
дифференци

Препарат  
кальным макс  
300 мг/кг.

Р. Берк  
ХВК является  
которая легко  
ции в растени

В/к и п/к  
получать пол  
ских антител  
ИФА).

ХВК име  
русами: с ВМ  
ВКПГ и 60%–

В

Вирус  
клевера (ВМБ

По данн  
симости от с  
м.м. более к  
та – 22,3 кДа  
1985), изолят

ВМБК па  
цы, но чаще  
*Trifolium* sp.;  
накопления в  
*sativum* L.; ко  
щее локальн



контакта корней в почве зооспорами гриба *Synchytrium endobioticum* (Анисимов, 2004; Власов, Самсонова, 2005), а также грызунами – совкой-гаммой и кобылками из рода *Melanophus*. Установлена возможность распространения ХВК через семена (Блоцкая, 1989). Вирус не переносится тлей, но может передаваться жуками и личинками картофельной коровки (цит. по: А.В. Крылов, 1992).

Распространен ХВК во всех районах возделывания картофеля.

В высокой концентрации вирус накапливается в растениях дурмана на 7–12-й день после инокуляции. Свежесорванные листья гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,5, с добавлением 0,3%-ного тритона В ( $K_2S_2O_5$ ). Экстракт осветляли смесью хлороформа с бутанолом ( $v/v = 1/7$ ). Вирус осаждали путем добавления к экстракту 4–5%-ного ПЭГ и 0,3 М NaCl. Дальнейшую очистку проводили 2–3 циклами дифференциального центрифугирования (36000 g × 90 мин и 5000 g × 10 мин).

Препарат вируса имеет типичный спектр поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 260 нм и минимумом при 245 нм. Выход вируса – 250–300 мг/кг.

Р. Беркс и Дж. Брандес (Bercks, Brandes, 1961) одними из первых отметили, что ХВК является сильным иммуногеном и обладает высокой антигенной активностью, которая легко выявляется в иммунохимических реакциях, а из-за высокой концентрации в растении может надежно выявляться в реакции КА.

В/к и п/к введение животным ХВК (100 мкг 4-кратно) с адъювантом позволяло получать поликлональные кроличьи антисыворотки с высоким титром специфических антител – 1:2048–1:8192 (КА), 1:512–1:2048 (РДД), 1:100000 (непрямой вариант ИФА).

ХВК имеет большой процент гомологии идентичных эпитопов с другими вирусами: с ВМБК – 90% (по результатам конкурентного варианта ИФА), до 40% – с ВКПГ и 60% – с ВАМК.

### Вирус мозаики белого клевера *White clover mosaic virus*

Вирус впервые описал В. Прайс (Price, 1935). Частицы вируса мозаики белого клевера (ВМБК) имеют модальные размеры – 480 × 12 нм (Поливанова и др., 1980).

По данным электрофореза в ПААГ м.м. РНК ВМБК составляет 2 мДа. В зависимости от срока хранения препараты вируса содержали от 1 до 2 полипептидов, м.м. более крупного белкового компонента составляла 24 кДа, а второго компонента – 22,3 кДа, который в ряде случаев являлся единственным белком (Артюкова и др., 1985), изоэлектрическая точка вируса – pH 4,5.

ВМБК поражает широкий круг растений, из культурных заражает табак и огурцы, но чаще всего – растения семейства бобовых. Диагностические виды: клевер *Trifolium* sp.; фасоль обыкновенная *Ph. vulgaris* (French bean) – лучшее растение для накопления вируса при получении очищенного препарата; горох обыкновенный *Pisum sativum* L.; коровий горошек *Vigna sinensis* Endl. – лучшее тест-растение, реагирующее локальными некрозами; бобы конские *Vicia faba* L. и огурец *Cucumer sativus* L.

ТТИ – 60 °С (для индийских штаммов – 75–80 °С), ПРС –  $10^{-5}$ – $10^{-6}$ , ПСИ – 10–100 сут (Berks, 1971).

В Приморском крае и на острове Сахалин вирус был выявлен при обследовании посевов гороха, белого и красного клеверов (Поливанова и др., 1977). На растениях клевера белого вирус вызывал симптомы от темно- до светло-зеленых пятен, деформацию и морщинистость листьев. У клевера красного наблюдались мозаичность листовой пластинки в виде светлых участков по жилкам листьев, крапчатость, деформация листьев и задержка роста растений. Выявленные изоляты ВМБК были разделены на две группы – мозаичные<sup>а</sup> и некротические<sup>б</sup>. Патогенность некротических штаммов была значительно выше, чем мозаичных. Механической инокуляцией вирус был передан на 52 вида растений. На растениях различных сортов клевера *Trifolium* sp. ВМБК вызывал такие симптомы, как мозаика, крапчатость, хлоротичная пятнистость, деформация и морщинистость листьев, задержка роста растений. Все сорта фасоли *Ph. vulgaris*, используемые в эксперименте, заражались вирусом. На молодых листьях развивалась хорошо заметная светлая пятнистость, посветление жилок. У некоторых сортов фасоли на инокулированных листьях сначала появлялись немногочисленные некрозы, иногда некротизировались жилки листьев. Наиболее четкие симптомы наблюдали на сортах Бонтифл, Сакса, Топ кроп и Грибовская. На растениях гороха *Pisum sativum* L. вирус вызывал темно-зеленую пятнистость, деформацию листьев, усыхание до полной гибели растения. На инокулированных листьях *Vigna sinensis* в зависимости от условий выращивания появлялись некрозы или хлоротичные округлые пятна, которые затем перерождались в некрозы и некротическую штриховатость. Системное поражение характеризовалось пятнистостью молодых листьев. У растений *Pisum sativum* после заражения дальневосточным изолятом ВМБК наблюдали усыхание нижних листьев и последующую гибель растения. Системное поражение проявлялось в виде темно-зеленой пятнистости, некоторой деформации листьев. Наиболее восприимчивые к вирусу были сорта Аляска, Раман и Адоптив. На инокулированных листьях *Vicia faba* на 3–5-й день появлялись некрозы с неправильным темно-коричневым окаймлением. Системная инфекция была выражена яркими некротическими линиями или хлоротичной пятнистостью (Поливанова и др., 1977).

Вирус был устойчив и инфицировал тест-растения даже после 10 дней выстаивания сока зараженных растений при комнатной температуре (18–24 °С), инфекционность вируса сохранялась при разведении инфекционного сока до  $10^{-6}$ , ТТИ – 65 °С (Поливанова и др. 1977).

Обычно для накопления вируса мы использовали растения *Ph. vulgaris* сорта Бонтифл (Bountiful). Листья снимали на 30-й день после инокуляции в период максимального накопления вируса в растении. Препарат вируса получали по методу Т. Мики и С. Кнайхт (Miki, Knight, 1967) с некоторыми модификациями. Гомогенизацию листьев проводили в 0,02 М фосфатном буфере, рН 7,6, с добавлением 0,1%-ного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и 0,2%-ного ЭДТА. Гомогенат центрифугировали (6–7000 г × 30 мин). Посторонние белки осаждали подкислением экстракта 10%-ной уксусной кислотой до рН 5,0. Через 1 ч жидкость центрифугировали (5–6000 г × 30 мин). Осадок отбрасывали, а вирус осаждали 4%-ным ПЭГ с 0,3 М NaCl и через 2 ч смесь центрифугировали в режиме



(11–12000  $g \times 15$ –20 мин). Осадки суспендировали в 0,13 М боратном буфере, рН 8,4–8,6, и центрифугировали (8–10000  $g \times 15$  мин). Экстрагирование осадков проводили трижды. Дальнейшая очистка вируса с последующим его концентрированием была проведена 1–2 циклами дифференциального центрифугирования (34000  $g \times 90$  мин, 5000  $g \times 10$  мин) и ультрацентрифугированием через слой 30%-ной сахарозы.

Препарат вируса имел типичный спектр поглощения нуклеопротеида с локальным максимумом при 260 нм и минимумом при 245 нм ( $A_{260/280}$ ) и спектр поглощения, скорректированный при светорассеивании = 1,2. Коэффициент экстинкции  $E_{0,1\%}^{1,260} = 3,1$  (Khadhair, Sinha, 1982). Выход вируса составил 40–70 мг/кг, что несколько выше, чем полученный ранее (10–40 мг/кг) (Поливанова и др., 1980).

ВМБК – хороший иммуноген. Как антиген в реакции капельной агглютинации формировал обильные хлопьевидные преципитаты. Любой способ введения вируса кроликам (1 мг при 3-кратной иммунизации) с адьювантом давал максимальный титр специфических антител – 1:512–1:2048 (КА), 1:128–1:256 (РДД), 1:25600 (непрямой вариант ИФА). По результатам конкурентного варианта ИФА, наибольший процент идентичных эпитопов вирус имел с ХВК (95,5%), с ВАМК – 66,6% и ВКПГ – 41,7%.

#### Антигенное родство дальневосточных изолятов потексвирусов

В настоящее время род *Potexvirus* объединяет 53 вида. За последние 20 лет по числу новых видов род мало увеличился, несмотря на то что помимо классических критериев в настоящее время широко используются критерии по исследованию генома потексвирусов. Мы провели сравнительную характеристику типичного представителя рода потексвирусов ХВК и истинных представителей потексвирусов – ВМБК и ВКПГ, а также возможных представителей рода – ВАМК и ВМПА. Выше были изложены результаты по морфологии вирионов, биологическим, физико-химическим и частично по антигенным свойствам, которые свидетельствовали о схожести этих данных для дальневосточных изолятов потексвирусов. Ниже более подробно остановимся на критерии, объединяющем вирусы в один род по антигенному родству, т.е. наличию у дальневосточных изолятов потексвирусов родо- и видоспецифичных идентичных эпитопов капсидных белков. Антигенные взаимоотношения ХВК, ВМБК, ВАМК и ВКПГ определяли как рутинными методами иммунохимического анализа, основанными на феномене агглютинации и преципитации – РДД, ВБА (виرو-бактериальная агглютинация), так и высокочувствительными – РИЭФ, ИЭМ, сэндвич-метод и конкурентный вариант ИФА. Все методики постановки были нами несколько модифицированы с учетом индивидуальных особенностей каждого из изучаемых потексвирусов.

РДД ставили в микромодификации. Так как потексвирусы из-за своего большого размера трудно проходят через поры агара, вирусные частицы разрушали на фрагменты ультразвуком или химическим путем с добавлением 1%-ного ДСН или других реагентов. Предметные стекла заливали 2,5–3,0 мл 1%-ного агара (Bacto agar, Ferrak, Berlin), расплавленного в том буфере, который применяли для выделения вируса, предварительно добавив в него до 1,5% ПЭГ.

РИЭФ проводили в обычной аппаратуре, используемой для электрофоретического разделения белков. Работали с 1%-ным раствором агарозы (Serva, FRG) на 0,075 М веронал-ацетатном буфере, рН 8,6, с ионной силой 0,1. Этим же буфером заполняли электрофоретическую камеру. В расплавленную агарозу добавляли 0,01% мертиола. При температуре 50 °С в него вносили антисыворотку в рабочем разведении. Гель равномерным слоем наносили на предметное стекло в объеме 2,5–3,0 мл. Вирус разводили тем же буфером. Концентрация вируса не превышала 1 мг. Перед внесением в лунки вирус обрабатывали ультразвуком в режиме 15 мин при 18 кГц.

Для постановки ВБА прежде всего требовалось приготовление диагностикума: 10%-ная суспензия формализированных клеток золотистого стафилококка штамм Кован-1 смешивали с 5 объемами антисыворотки в рабочем разведении. На предметном стекле каплю диагностикума перемешивали с вирусным препаратом или соком зараженного растения и через 3–20 мин оценивали полученный результат.

ИФА ставили по нашим модифицированным методикам (Сибирякова, 1987; Гнутова, 1993).

В основу постановки ИЭМ был взят принцип «декорирования» вирусных частиц специфическими антителами (Рублева, Гнутова, 1985).

Все поликлональные антисыворотки взаимодействовали с гомологичным вирусом в КА при довольно большом разведении – 1:2048–1:4096. Наиболее активными иммуногенами были ХВК и ВМБК, слабее ВКПГ. ВАМК формировал линию преципитации с гомологичной антисывороткой в РДД при разведении последней 1:8–1:32, в то время как в КА он вел себя как активный антиген.

Данные, полученные в РДД, свидетельствовали о близком антигенном родстве между исследуемыми потексвирусами. В реакции были использованы фрагментированные вирусные частицы. Исключение составил ХВК, так как он реагировал со специфическими антителами без предварительной деградации вирионов. Показано, что обработка вирусных частиц ультразвуком (10–15 мин при 15–20 кГц) – эффективный прием. Использование 0,05–0,1%-ного ДСН требует строгого контроля, так как иногда образовывались неспецифические преципитаты. При применении 0,1%-ного твин-20 линии преципитации имели диффузный характер. В качестве контроля антисывороток использовали сыворотку неиммунизированного животного (Ас-к), а антигенов – соки не зараженных растений (Аг-к) (рис. 104).

Метод РИЭФ подтвердил антигенное родство потексвирусов (рис. 105). Преципитат в виде ракеты формировался при концентрации вируса 0,6–1,0 мг/мл. Разведение антисывороток для ХВК и ВМБК составило – 1:50, ВАМК – 1:30 и ВКПГ – 1:40–1:50. Препараты вирусов, хранившиеся более месяца, слабо или вообще не взаимодействовали в РИЭФ с антителами.

Реакцией ВБА также было показано антигенное родство между изучаемыми потексвирусами. Антисыворотки имели рабочее разведение для ХВК и ВКПГ – 1:100–1:200, для ВМБК – 1:200–1:300 и ВАМК – 1:100–1:400. Концентрация антигена не превышала 0,5–1,0 мг/мл (табл. 46, 47). Чувствительность метода ВБА 0,1 мкг/мл (Чирков, 2009).

Рис.  
потексвиру  
По перифе  
(Г) – контр

Конт  
(Сибиряк  
ства у по  
ции комп.

Мет  
только на  
гих предс  
пени (Руб  
интенсив  
в гомолог  
диаграмм  
антигенн  
сов. ИЭМ  
между ХВ  
90%), сла  
с ВКПГ, в  
центном  
перекрест  
(до 83%),  
взаимодей  
вались ра  
ХВК (род  
(до 77%)  
ство пока  
почти не р  
ВМБК (р



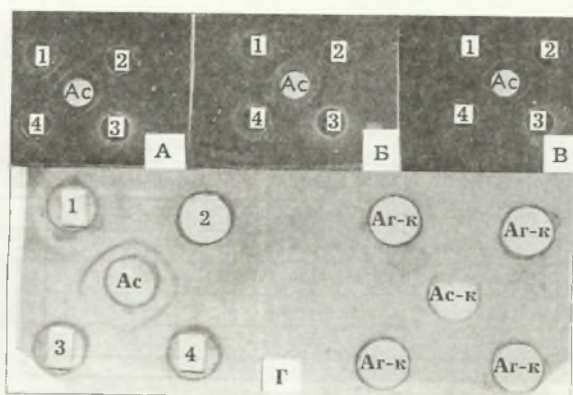


Рис. 104. Выявление идентичных родоспецифичных эпитопов у дальневосточных изолятов потексвирусов в РДД. В центре – Ас к ХВК (А), к ВАМК (Б), к ВКПГ (В), ВМБК (первая лунка Г). По периферии – Аг: 1 – ХВК, 2 – ВАМК, 3 – ВКПГ, 4 – сок здорового растения (А, Б, В, Г), справа (Г) – контроль: в центре – Ас-к, по периферии – Аг-к

Конкурентный вариант ИФА, разработанный нами для потексвирусов (Сибирякова и др., 1987), позволил не только установить наличие антигенного родства у потексвирусов в процентном отношении, но и рассчитать константы ассоциации комплекса антиген–антитело.

Метод ИЭМ наглядно продемонстрировал сорбцию специфических антител не только на гомологичном потексвирусе, но и на других представителях этого рода, хотя и в разной степени (Рублева, Гнутова, 1985). При обозначении интенсивности покрытия вирионов антителами в гомологичной системе в 100% были построены диаграммы, по которым можно было судить об антигенных взаимоотношениях изучаемых вирусов. ИЭМ отмечено высокое антигенное родство между ХВК и антисывороткой против ВМБК (до 90%), слабое с ВАМК (до 12%) и незначительное с ВКПГ, которое не сумели даже выразить в процентном отношении. ВАМК четко реагировал в перекрестной реакции с антителами против ВКПГ (до 83%), слабее – с ВМБК (до 36%) и почти не взаимодействовал с ХВК. Вирионы ВМБК покрывались равномерным тонким слоем антител против ХВК (родство до 50%), ВАМК (до 85%) и ВКПГ (до 77%). ВКПГ самое высокоантигенное родство показал с антителами против ХВК (до 79%) и почти не реагировал с антителами против ВАМК и ВМБК (рис. 106).

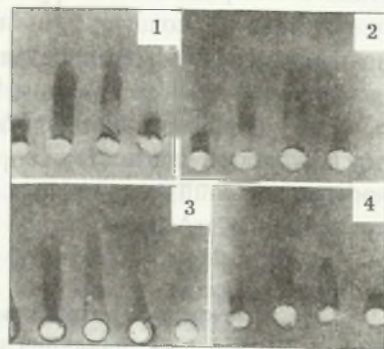


Рис. 105. Выявление идентичных родоспецифических эпитопов у дальневосточных изолятов потексвирусов РИЭФ. В геле – Ас к ХВК (1), ВМБК (2), ВАМК(3), ВКПГ(4); в лунках – Аг (1 мг/мл) – слева направо: ХВК, ВАМК, ВКПГ, ВМБК (1); ВМБК, ВАМК, ВКПГ, ХВК (2); ВАМК, ВМБК, ВКПГ, ХВК (3); ВКПГ, ХВК, ВАМК, ВМБК (4)

Степень антигенного родства потексвирусов, выявленная ВБА

Антиген	Антисыворотка			
	ХВК	ВАМК	ВМБК	ВКПГ
ХВК	++++/++++	++/++	+++/+++	++/++
ВАМК	+++/+++	++++/++++	++/++	++/+++
ВМБК	++/+++	++/++	++++/++++	++/++
ВКПГ	++/++	++/+++	++/++	++++/++++
Контроль*	—	—	—	—

\* Сок здорового растения.

Надо отметить, что результаты в значительной степени зависели от качества антисывороток. К сожалению, из-за низкого титра специфических антител мы могли использовать не все партии антисывороток, приготовленные нами, например, к ВАМК и ВКПГ, хотя потексвирусы считаются сильными иммуногенами. Некоторые из них не гарантировали надежных результатов при постановке РДД или РИЭФ. Если раньше выявить антигенное родство между многими потексвирусами было невозможно из-за невысокой чувствительности используемых иммунохимических методов, то сейчас имеющийся набор высокочувствительных методов иммуноанализа позволяет установить идентичность эпитопов потексвирусов, считающихся даже возможными представителями рода потексвирусов. В настоящее время для определения ХВК и УВК разработаны технологии мультимембранных композитов (тест-полосок) для иммунохроматографического определения (Чирков, 2009). Вирусы выявляются в концентрации до 80 нг/мл за 5–10 мин. Кроме того, разработаны наборы, включающие тест-полоски и принадлежности для быстрого получения без вспомогательного оборудования результатов диагностики вирусов в полевых условиях. Другие методы выявления вирусов растений, поражающих картофель, приведены в разделе рода *Carlavirus* для детекции SBK и MBK.

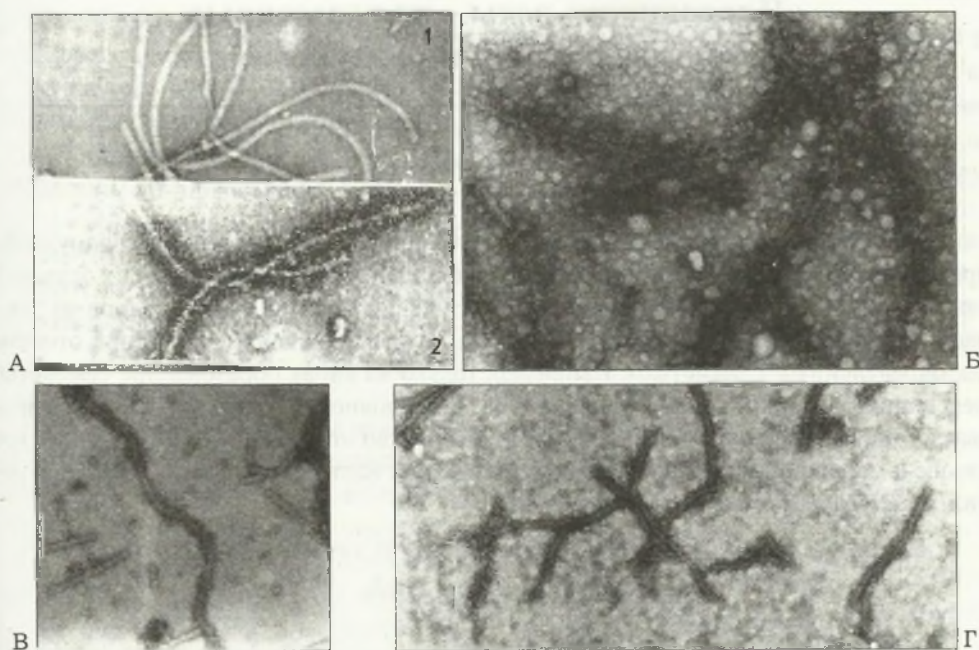
Таблица 47

Перекрестное титрование вирусных антигенов в гомо- и гетеросистемах в реакции виробактериальной агглютинации

Антигены	Титр антисывороток			
	ХВК	ВАМК	ВМБК	ВКПГ
ХВК	1:256	1:64	1:128	1:64
ВАМК	1:32	1:64	1:16	1:16
ВМБК	1:128	1:32	1:256	1:32
ВКПГ	1:64	1:32	1:64	1:128
Контроль*	—	—	—	—

\* Сок здорового растения.





**Рис. 106.** Электронная микрофотография декорированных вирионов потексвирусов в ИЭМ. А: 1 – ВАМК (препарат вируса); 2 – декорированные специфическими Ат вирионы ВАМК. Декорированные вирионы ХВК специфическими Ат (Б), ВКПГ (В) и ВАМК Ат против ХВК (Г)

Таким образом, иммунохимические исследования с помощью современных высокочувствительных методов иммуноанализа выявили антигенное родство между четырьмя дальневосточными изолятами потексвирусов. Для ХВК и ВМБК оно было самым высоким – до 90%, наименьшим (до 40%) – у ВКПГ, а ВАМК занимал промежуточное положение – до 60% родства, что позволило с уверенностью отнести его к типичному виду рода потексвирусов. Эти данные согласуются с результатами при сравнении структурных компонентов этих вирусов (Артюкова, Крылов, 1989).

Что касается дальневосточного изолята вируса мозаики подорожника азиатского, то он пока не включен МКТВ в список рода *Potexvirus*, в списке присутствуют сейчас два потексвируса, идентифицированных из растений подорожника – вирус суровой крапчатости подорожника *Plantago severe mottle virus* и X-вирус подорожника *Plantanium virus X*. Дальневосточный изолят потексвируса, выявленный из растений подорожника азиатского, по своим свойствам, вероятнее всего, является либо X-вирусом подорожника (нужны дополнительные исследования), либо самостоятельным видом рода потексвирусов.

## «Плавающие» роды – не отнесенные к какому-либо определенному семейству

Количество так называемых «плавающих» родов, не отнесенных к какому-либо определенному семейству, еще пять лет назад было 24, в настоящее время их осталось чуть более 10. Это произошло в результате изучения геномов многих видов из этих родов, что наряду с классическими критериями идентификации позволило отнести их к определенным семействам. Например, только во вновь образованное семейство флексивирида вошло 8 «плавающих» родов. Безусловно, с годами таксономия вирусов растений будет более совершенной, и количество «плавающих» родов будет все меньше и меньше. В настоящее время в ДФО из них идентифицированы вирусы 3 родов: *Hordeivirus*, *Tobravirus* и *Tobamovirus*.

### Род *Hordeivirus*

Типовой вид рода *Hordeivirus* – вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ) *Barley stripe mosaic virus*. Вирус дал название роду: *hordei* – от латинского названия растения-хозяина *Hordeum* – ячмень. Род немногочислен и включает 4 вида.

**Свойства вирионов. Морфология.** Вирионы – прямые, жесткие палочки размером 110–150 × 20 нм со спиральной симметрией и шагом 2,5 нм.

**Физико-химические и физические свойства.** Коэффициент седиментации одних видов около  $S_{20,w}$  182–193 S, у других – 165–200 S. Изоэлектрическая точка вирионов – рН 4,5.

**Нуклеиновая кислота.** Вирионы содержат три молекулы линейной (+)онРНК: РНК  $\alpha$  – 3,8 т.о., РНК  $\gamma$  – 3,8 т.о. и РНК  $\beta$  – 3,2–2,8 т.о. У аргентинского штамма ВШМЯ выявляется четвертая РНК длиной 2,5 т.о., у других вирионов также обнаружены другие РНК, субгеномные или дефектные с разными размерами (от 800 до 2900 т.о.). Геномные РНК имеют кеп ( $m^7GpppGUA$ ) на 5'-конце, а на 3'-конце – поли(А)-тракт из 8–40 нт., за которым следует высококонсервативная тРНК-подобная структура из 236–238 нт. которая аминокислотится тирозином.

**Белки.** Один капсидный белок с м.м. 22 кДа.

**Липиды и углеводы** в вирионах достоверно не выявлены.

**Организация и репликация генома.** Геном ВШМЯ кодирует семь белков. Из них белок  $\alpha$  (130 кДа) является, предположительно, вирусной репликазой и транслируется с единственной ОРС  $\alpha$ . РНК  $\beta$  кодирует четыре белка: капсидный белок  $\beta$  (22 кДа) с ОРС вблизи 5'-конца, а после междугенного участка 147 нт. расположены ОРС тройного блока неструктурных белков  $\beta$ b (60 кДа),  $\beta$ c (17 кДа) и  $\beta$ d (14 кДа), его ген перекрывает гены белков  $\beta$ b и  $\beta$ c. Эти белки участвуют в движении вируса *in situ*. РНК  $\gamma$ , различная по размеру у разных вирусов и штаммов, кодирует белок  $\gamma$ a



(74–87 кДа), который участвует в репликации, и белок  $\gamma$  (14 кДа). Последний транслируется с субгеномной РНК, содержит участок, богатый цистеином, и может влиять на экспрессию генов РНК  $\beta$ . Все Геномные РНК необходимы для системной инфекции. Для репликации в протопластах достаточно присутствия только РНК  $\alpha$  и РНК  $\gamma$ . В инфицированных растениях выявляются РФ РНК всех геномных РНК. Вирусные частицы локализуются в цитоплазме и ядре.

**Антигенные и биологические свойства.** Хордеи вирусы являются активными иммуногенами, разные виды имеют отдаленное антигенное родство. Вирусы поражают в основном злаковые культуры, только вирус кольцевой пятнистости зорьки *Lychnis ringspot virus* поражает растения из семейств *Caryophyllaceae* и *Labiatae*.

ТТИ – 63–70 °С, хордеи вирусы сохраняют инфекционность в соке несколько дней или недель.

Переносчики вирусов неизвестны. ВШМЯ передается семенами, пылью и при контакте растений (характеристика рода цит. по: В.Г. Краев, 2001).

### Вирус штриховатой мозаики ячменя *Barley stripe mosaic virus*

Впервые вирус был описан McKinney в США в 1951 (цит. по: Можяева, 2003). Вирус распространен во всем мире. В бывшем СССР заболевание злаков, возбудителем которого являлся вирус штриховатой мозаики ячменя (ВШМЯ), впервые обнаружено И.Г. Атабековым и Г.М. Развязкиной в 1961 г. Вирус в 50–60-е годы был зарегистрирован практически во всех регионах страны, где возделывались злаковые культуры.

ВШМЯ имеет палочковидные вирионы длиной от 110 до 160 нм (рис. 107).

Свойства вируса и его структурных компонентов впервые были изучены И.Г. Атабековым и В.К. Новиковым (Атабеков, Новиков, 1966; Atabekov, Novikov, 1989).

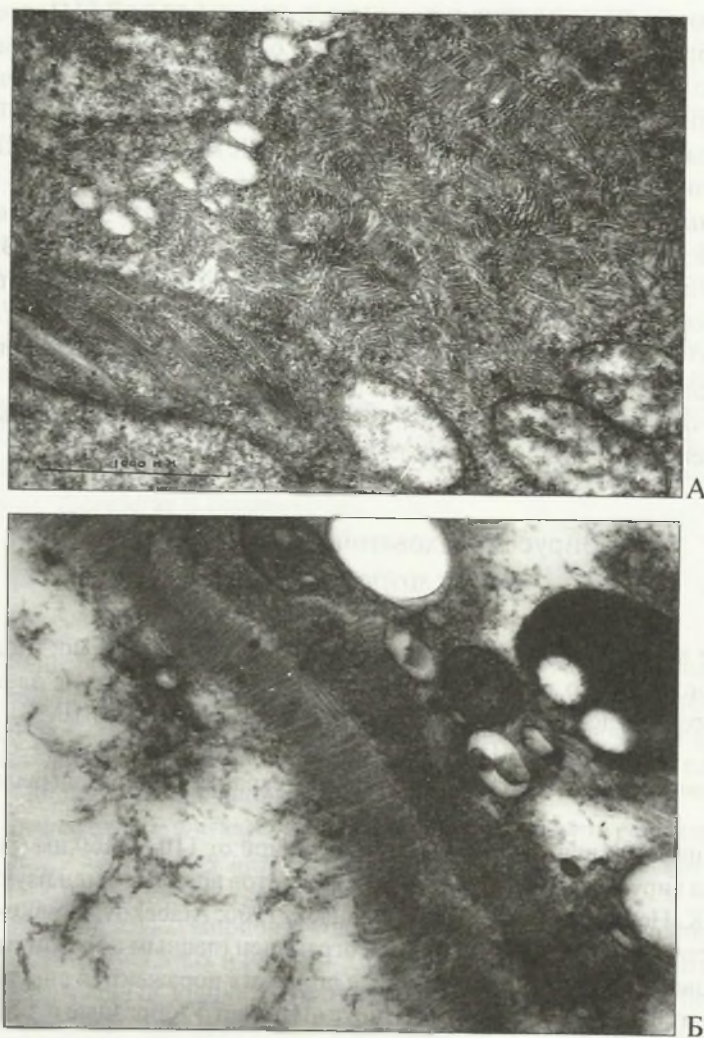
Круг растений-хозяев весьма узкий и ограничен главным образом растениями семейства злаковых (пшеница, овес, ячмень и др.). Хотя поражаются вирусом и двудольные растения из нескольких семейств. Вирус вызывает У-образные и зигзагообразные темно-коричневые штрихи (некрозы) на листьях преимущественно среднего яруса. На листьях верхнего яруса развиваются симптомы мозаики, обычно не сопровождающиеся некротизацией.

Вирус – сильный иммуноген.

ВШМЯ передается механически, а также семенами (до 90%) и пылью. Может сохраняться в семенах в течение 5 лет. Переносчики пока не известны.

Вирус имеет распространение во всем мире. Экономический ущерб наносит культуре ячменя. Потери урожая зерновых культур, особенно ячменя, в некоторые годы может достигать 30–40%. Это происходит за счет уменьшения числа продуктивных стеблей и числа зерен в колосе.

Первые данные о ВШМЯ на Дальнем Востоке России были получены С.Б. Герасимовым, который обнаружил вирус в семенах ячменя, присланных из Владивостока.



**Рис. 107.** Электронная микрофотография вируса штриховатой мозаики ячменя (фото Н.П. Черемушкиной). Препараты: А – из листа пшеницы, Б – из пыльцы ячменя

ского сортоучастка (цит. по: А.В. Крылов, 1992). Позже о поражении злаков ВШМЯ рода хордеовирусы сообщила Е.Е. Бородина (Соколова), ею вирус был выявлен из растений ячменя и пшеницы в нескольких районах Приморского края (Соколова, 1978; Бородина, 1982). Внешние симптомы болезни на ячмене, по описанию автора, напоминали поражение гельминтоспореозом. У пораженных растений наблюдалась низкорослость, они были вдвое ниже здоровых.

На листьях ячменя симптомы варьировались от слабой до очень яркой мозаики. Мозаику составляли чередующиеся светло-зеленые полосы, распространяющиеся от



основания к вершине листа. Полосы шли вдоль жилок листа параллельно друг другу, меняясь по ширине и прерываясь. Некоторые листья становились бледно-желтыми со следами мозаичности и некроза. Нередко встречались желтолистность, белolistность, пятнистость, крапчатость, сильная карликовость и летальный некроз. На пшенице развивались светло-желтые или бесцветные полосы, которые могли сливаться, и листья становились почти белыми. Е.Е. Бородина изучила 20 видов злаков, которые поражались ВШМЯ, среди них просо, кукуруза, рис, сорго и некоторые виды диких злаков.

В инфицированных растениях с помощью электронного микроскопа были обнаружены палочковидные частицы размером 120 нм.

По данным Е.Е. Бородиной, ПРС –  $10^{-4}$  и ПСИ – 20–24 сут.

Вирус передавался контактно, инокуляцией соком, семенами (до 40%) большинства зерновых культур, исключая кукурузу, и пылью. Зараженные вирусом растения ячменя и пшеницы снижали массу зерна до 50%, вирус служил причиной высокого процента стерильных цветков (25%). Другие свойства вируса описаны нами выше при характеристике рода хордеивирусы.

Для диагностики ВШМЯ используют ИФА, ИСЭМ и ПЦР. К.А. Можая с сотрудниками в 2003 г. с помощью ИФА выявила этот вирус в дальневосточном полевом материале (личное сообщение).

В последнее десятилетие целенаправленного изучения ВШМЯ в России не ведется. На ДВ России, по мнению А.В. Крылова (1992), ВШМЯ, скорее всего, завезли с семенами, так как циркуляция вируса затруднена из-за практически отсутствия посевов озимых. В ДФО в последние годы изучались некоторые вопросы эпидемиологии, визуально выявили очаги инфекции, изучили влияние погодных условий на вирусную инфекцию, способы передачи вируса в природе и т.д. (Дьяконов, Сапоцкий, 2001).

### Род *Tenuivirus*

Название рода *Tenuivirus* произошло от латинского слова *tenuis* – тонкий, слабый. Типовой вид рода – вирус штриховатости риса (ВШР) *Rice stripe virus*. Род немногочислен – включает до десяти типичных и предполагаемых видов.

**Свойства вириона. Морфология.** Вирионы имеют вид тонких волокон. Они состоят из нуклеокапсидов диаметром 9–10 нм и лишены оболочки. Длина частиц пропорциональна размеру их РНК, вирионы могут приобретать спиральную, ветвистую и циркулярную форму.

**Физико-химические и физические свойства.** При центрифугировании вируса в градиенте плотности сахарозы образуют 4–5 компонентов. При равновесном центрифугировании в CsCl наблюдается одна зона с плавучей плотностью 1,282–1,288 г/см<sup>3</sup>.

**Нуклеиновая кислота.** РНК вирионов сегментирована и состоит из 4 разных видов с размерами: РНК 1 – 10,0; РНК 2 – 3,4–3,6; РНК 3 – 2,3–2,5 и РНК 4 – 2,0–2,2 т.о. Вирус штриховатости кукурузы *Maize stripe virus* содержит еще и пятую РНК с размером – 1,3 т.о. Известна нуклеотидная последовательность РНК этого вируса и ВШР.

**Белки.** Белки нуклеокапсида имеют м.м. 31–34 кДа. У вируса травянистой карликовости риса *Rice grassy stunt virus* выделено два вида структурного белка. В инфицированных растениях и вирофорных дельфацитах – переносчиках вирусов – обнаружен неструктурный белок 20 кДа. В растениях, зараженных вирусом полосатости кукурузы, зарегистрирован белок 165 кДа, а в растениях, инфицированных ВШР и вирусом травянистой карликовости риса, – белок 230 кДа, который, вероятно, является РНК-зависимой РНК-полимеразой, активность которой связана с волокнистыми нуклеокапсидными частицами.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

**Организация и репликация генома.** 3'- и 5'-концевые последовательности каждой онРНК комплементарны почти на 20 оснований. РНК 3 или РНК 4 вирусов штриховатости риса и штриховатости кукурузы кодируется два белка с двухсмысловым расположением (структурой). Белок нуклеокапсида кодируется 5'-проксимальным участком (–)нити РНК 3. Неструктурный белок кодируется вирусной смысловой последовательностью в 5'-проксимальном участке РНК 4.

**Антигенные свойства.** ВШР имеет антигенное родство с вирусом штриховатости кукурузы, слабое – с вирусом травянистой карликовости риса.

**Биологические свойства.** Хозяевами тенуивирусов являются только растения семейства *Gramineae*. Вирусы передаются дельфацитами (цикадками) полуперсистентным способом, в некоторых случаях происходит трансвариальная передача. Экспериментальная передача соком затруднительна (характеристика рода цит. по: Краев, 2001)

## Вирус штриховатости риса

### *Rice stripe virus*

Частицы ВШР – разветвленной нитевидной формы, шириной около 8 нм.

Круг растений-хозяев широкий среди растений семейства злаковых.

Вирус довольно широко распространен в странах АТР (Murayama, 1998). Болезнь, вызываемая ВШР, известна с середины прошлого столетия в Японии (Iida, 1969), на юге Кореи (Lee, 1961). Присутствие вируса на посевах риса в сопредельных странах (КНР, КНДР, Япония) давало основание предположить о наличии подобного вирусного заболевания и в Приморском крае – рисосеющем регионе Дальнего Востока России. В конце 70-х годов на посевах риса в Приморском крае было зарегистрировано вирусное заболевание с симптомами, характерными для ВШР (Немилюстев, 1978). Первые признаки заболевания проявлялись в конце июля в виде беловатых штрихов, расположенных вдоль средней жилки листа; отдельные штрихи сливались, образуя белые полосы. В период выметывания колоса и созревания зерна пораженные растения были особенно заметны, так как образующиеся на них метелки оставались бледно-зеленой или белой окраски. Второй характерный симптом – низкорослость и задержка выметывания колоса. Вышедшие метелки имели неправильную, уродливую форму, зерно шуплое; обычно метелки стерильны, иногда они совсем не выходили из



влагалища вследствие того, что последний лист не раскрывался, а срастался в трубку; листья часто закручивались. Автором также установлено, что вирус переносится темной цикадкой *Laodephax striatellus* Fall. (семейство *Delphacidae*), исследована экология и биология переносчика. Для проверки способностей темной цикадки переносить ВШР на растения риса в возрасте 2–3 листочков в специальные садки подсаживались личинки и имаго насекомого, предварительно питавшегося на растениях с симптомами вирусного поражения. ВШР передали 20% цикадок (Пинскер, 1973).

Механическим путем вирус не передавался. При световой микроскопии в тканях листа риса с симптомами штриховатости в клетках эпидермиса листового влагалища обнаруживались паракристаллические включения в виде петель, восьмерок, колец. Иногда включения распадались на игловидные кристаллы. В полевых образцах растений риса, отобранных с помощью специфической антисыворотки, в электронном микроскопе наблюдались частицы тонкой нитевидной формы (Немилостева, 1978).

Для получения кроличьей антисыворотки вирус выделяли из полевого материала с симптомами штриховатости. В основу методики получения очищенного препарата был взят метод японских исследователей (Suzuki, Kimura, 1960). Листья гомогенизировали в 0,01 М фосфатном буфере, рН 7,2. Осветление гомогената проводили хлороформом (1/7). Из экстракта вирус осаждали ПЭГ. Дальнейшую очистку проводили с помощью дифференциального центрифугирования. Полученный препарат характеризовался типичным спектром поглощения в ультрафиолетовой области с локальным максимумом при 260 нм и минимумом при 240 нм. Антиген вводили внутривенно в течение 2 нед, увеличивая начальную дозу. Титр специфической антисыворотки по результатам КА был 1:2048. Антисыворотка к японскому изоляту ВШР, полученная от д-ра Р. Кисимото (R. Kisimoto, префектура Кюсю, с/х экспериментальная станция, Япония), четко реагировала с соком больных растений, имеющих симптомы штриховатости риса (Гнutowa, Пинскер, 1976). Этот результат свидетельствовал в пользу того, что дальневосточный изолят ВШР по антигенным свойствам близок к японскому. С помощью антисыворотки была подтверждена вирусная этиология заболевания на рисе. Для выявления круга растений-хозяев ВШР (большинство из них являются бессимптомными носителями вируса) и зараженности культивируемых в Приморском крае сортов риса был применен серологический анализ. Латентными носителями вируса оказались 10 видов из семейства злаковых (в том числе *Setaria glauca*, *S. Italica*, *Alopecurus aequalis*, *Phragmites communis*, *Glyceria triflora*) и два вида осоковых (в том числе *Cyperus truncates*), произрастающих на валиках рисовых полей. ВШР в различной степени были поражены растения всех районированных в крае сортов риса.

Таким образом, на основании внешних симптомов, круга растений-хозяев, результатов изучения антигенных свойств, наличия характерных внутриклеточных включений и передачи вируса темной цикадкой мы сделали заключение о распространении в Приморском крае вируса штриховатости риса (Рейфман и др., 1975).

Род *Tobamovirus*

Род *Tobamovirus* включает 13 видов и 2 возможных представителя. Название рода происходит от начальных букв английских слов типового представителя – вируса табачной мозаики (ВТМ) *Tobacco mosaic virus*.

**Свойства вириона. Морфология.** Вирусы этого рода – удлиненные жесткие частицы длиной 300 нм и диаметром 18 нм со спиральной симметрией и шагом спирали 2,3 нм.

**Физико-химические и физические свойства.** М.м. вириона 40 кДа,  $S_{20,w}$  – 194 S, плавучая плотность в CsCl – 1,325 г/см<sup>3</sup>, частицы очень стабильные.

**Нуклеиновая кислота.** Вирионы содержат одну молекулу линейной (+)онРНК с м.м. 2 мДа, длиной 6,4 т.о. и субгеномные РНК. На 5'-конце РНК находится кеп-структура и следующая за ней нетранслируемая последовательность длиной 70 нт., содержащая много повторов ААС и почти не содержащая G; 3'-концевой нетранслируемый участок длиной 200 нт образует тРНК-подобную структуру.

**Белки.** Один полипептид оболочки с м.м. 18 кДа. В цитоплазме инфицированных клеток выявляются неструктурные белки с м.м. 126–129, 183–187 и 28–31 кДа. Белок 183–187 кДа образуется при просчитывании терминирующего кодона гена V, кодирующего белок 126–129 кДа. Эти белки содержат ферменты репликации – РНК-репликазу или ее компоненты. В N- и C-концевых участках белка с м.м. 126–129 кДа локализируются последовательности метилтрансферазы/гуанилтрансферазы и РНК-геликазы, включая НТФ-связывающий участок. C-концевая часть белка 183–187 кДа имеет мотивы РНК-зависимой РНК-полимеразы. Белок 28–31 кДа является транспортным белком, он обнаружен в плазмодесмах.

Определена полная нуклеотидная последовательность геномной РНК вируса слабой зеленой мозаики табака *Tobacco mild green mosaic virus (U2-strain)*, обнаружено 64,4 % гомологии последовательностей с геномной РНК у ВТМ (Solis, Carcia-Arenal, 1990). Гомология последовательностей геномной РНК ВТМ и у вируса кольцевой пятнистости одонтоглоссума *Odontoglossum ringspot virus* составила 71 % (Duds, Van Regenmortel, 1990). Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (штамм W) *Cucumber green mottle mosaic virus (W-strain)* является близкородственным ВТМ, и белки оболочки этих вирусов на 36 % гомологичны. Японские исследователи (Isomura et al., 1990) секвенировали кДНК с мРНК белка межклеточного транспорта вируса кольцевой пятнистости одонтоглоссума, который состоял из 304 аминокислотных остатков и на 70 % был гомологичен белку 30 кДа межклеточного транспорта ВТМ.

**Организация генома и репликация.** Геном кодирует четыре белка: 126 и 183 кДа (репликаза или ее компоненты), 30 кДа (транспортный белок) и капсидный белок 18 кДа. Геномная (+)РНК копируется, образуя (–)РНК, на которой синтезируется геномная и субгеномные (+)РНК. Белки 126 и 183 кДа транслируются с геномной РНК; транспортный и капсидный белки – с 3'-концевыми субгеномными мРНК.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.

Вирус  
клетке кри  
методы пр  
рентгенов  
ществена  
обнаружен  
α-спираль  
(Lobert, St

Али  
гены. Они  
хорошую  
видами ро

ГТИ  
от нескол

Бел  
них вирус

Тоби

вирусы пе

ние и печ

не перед

служить

мы и для

Виру  
рашиваю

На Д  
ики (ВТМ

Виру

et al., 19

4, 98. М

свойства

*mosaic* и

и ВТМ и

*Cucumber*

А.М. Вор  
Виру  
заражает  
огурца т  
1998).



Вирусы продуцируются в цитоплазме, индуцируя образование характерных в клетке кристаллических включений, видимых в световом микроскопе. Разработаны методы получения карт электронной плотности на основании данных дифракций рентгеновских лучей на ориентировочных нитях. При разрешении 5 ангстрем существенного различия между ВТМ и вирусом зеленой крапчатой мозаики огурца не обнаружено, не считая несколько большего расстояния по оси между двумя слоями  $\alpha$ -спирали одной субъединицы в случае вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (Lobert, Stubbs, 1990).

**Антигенные и биологические свойства.** Тобамовирусы – активные иммуногены. Они легко определяются в различных иммунохимических реакциях, проявляя хорошую антигенную активность капсидного белка. Однако степень родства между видами рода различна.

ТТИ большинства вирусов этого рода – в пределах 90 °С, устойчивость в соке – от нескольких месяцев до многих лет.

Большинство членов рода имеют узкий или умеренный круг растений-хозяев. На них вирусы вызывают симптомы крапчатости, мозаики, деформации, некротизации.

Тобамовирусы легко передаются механической инокуляцией сока. Некоторые вирусы передаются семенами, контактным способом от больного на здоровое растение и почвой. Исключительной особенностью вирусов этого рода является то, что они не передаются насекомыми. Тем не менее некоторые грызущие насекомые способны служить источником передачи вируса растению. Это отмечено для гусениц совки гаммы и для кобылок *Melanoplus differensialis* (Молдован, 1979).

Вирусы этого рода широко распространены практически по всему миру, где выращиваются табак, овощные и декоративные культуры.

На Дальнем Востоке России идентифицированы 3 тобамовируса: табачной мозаики (ВТМ), мозаики томата (ВМТо) и зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО).

### Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца *Cucumber green mottle mosaic virus*

Вирионы вируса палочковидные, 300 нм длиной и 17–18 нм шириной (Hollings et al., 1975). Коэффициент сидементации  $S_{20, w}$  – 185 S, изоэлектрическая точка – 4,98. М.м РНК – 2 мДа, м.м белка – 17,2 кДа. Другие биохимические и биофизические свойства вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)* представлены в VII Докладе МКТВ (2000). Между ВЗКМО и ВТМ гомология в структуре генома составляет 36 %. Ранее вирус имел название *Cucumber virus-3*, *Cucumber virus-4* (Одинцова и др.). В России вирус впервые описал А.М. Вовк в 1942 г. (цит. по: Власов, 1992).

Вирус имеет довольно ограниченный круг растений-хозяев, главным образом заражает растения из семейства тыквенных *Cucurbitaceae*. Вирус встречается кроме огурца также на арбузе, дыне и тыкке посудной (*Lagenaria siceraria*) (Onki, Inouye, 1998).

На арбузе симптомы зависят от сорта растения (от латентной формы или слабой мозаики до некрозов). Арбуз за рубежом известен как природный хозяин вируса. Дыня реагирует на заражение вирусом слабой мозаикой на листьях на 15 сут после заражения. Некоторые сорта тыквы, кабачков, патиссонов вообще не заражались вирусом (Власов, 1992).

Растением, из которого он впервые выявлен, был огурец обыкновенный *Cucumis sativus*. На листьях огурца вирус вызывает сначала потемнение жилок, а затем хлоротичную пятнистость, пузыревидность между жилками. Иногда при заражении ВЗКМО на листьях растений развивается мозаика в виде чередования светло- и темно-зеленых участков. Разновидность болезни, вызываемая вирусом – белая мозаика, когда появляются белые или желтые пятна звездчатой формы. Растения отстают в росте, стареют и отмирают раньше здоровых. Плоды отличаются мелкими размерами, деформацией, мозаичной расцветкой (рис. 108). Тест-растениями вируса являются *C. sativus*, *N. tabacum*, *Ch. amaranticolor*, *P. hybrida*, *D. stramonium*.

Описаны европейские и азиатские штаммы ВЗКМО: *common cucumber virus 3*, *cucumber virus 4*, арбузный *Watermelon CGMMV-W*, огуречный *cucumber CGMMV-C*. Но наиболее упоминаемые в литературе – огуречный и арбузный штаммы ВЗКМО (Takahashi et al., 1989). Типичный штамм ВЗКМО вызывает у огурцов зеленую мозаику, а наиболее вредоносный – белую. При зеленой мозаике на листьях наблюдаются темно- и светло-зеленые участки, а при белой – белые или желтоватые пятна звездчатой формы. Плоды мелкие, деформированные, мозаичные. Симптомы на листьях обычно начинают появляться на 10–15 сут. В последние годы в разных регионах Украины (Крым и Карпаты) выявлены 2 изолята ВЗКМО с размером палочковидных вирионов 280–300 нм × 15 нм, м.м. структурных белков 20 кДа (Ryzhkova et al., 2002; Руднева и др., 2005). Специфическая антисыворотка, по результатам непрямого варианта ИФА, имела титр 1:120000. Оба изолята ВЗКМО не проявили антигенного родства к ВТМ.

ВЗКМО имеет, по литературным данным, ТТИ – 80–100 °С, ПРС –  $10^{-6}$ – $10^{-7}$ , ПСИ – 7 мес при комнатной температуре (Hollings et al., 1975), а выявленный изолят вируса в Украине: ТТИ – 85–90 °С, ПРС –  $10^{-10}$ , ПСИ – более года (Билай и др., 1988).

Первичный источник распространения вируса – семена, собранные с зараженных растений. Семенная передача установлена до 8 % у огурцов и до 5 % у арбузов, зараженных ВЗКМО (Hollings et al., 1975). Этот вирус может содержаться до 94 % в семенах томатов (Hollings, Huttinga, 1976). Другой способ передачи вируса – почвой.

Инфекция сохраняется несколько месяцев в зараженной почве и в гидропонном субстрате при выращивании растений в теплице, а также на конструкциях теплиц. Однако основной способ передачи вируса, особенно в теплицах, – контактный с помощью инфекционного сока (Власов, Самсонова, 2005; Onki, Inoue, 1998).

География распространения – Япония, Индия и Европа. Наиболее часто встречается в условиях закрытого грунта, в том числе и в России.

Вирус обнаружен в Приморском крае на растениях огурца в посадках открытого грунта с симптомами мозаики, сопровождающейся деформацией и пузыревидностью листьев (Теплоухова и др., 1987). В процессе исследования изучались морфология вирусных частиц, круг поражаемых растений, физические свойства вирионов.





Рис. 108. Симптомы вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (закрытый грунт)

Полученная антисыворотка имела невысокий титр и в разведении 1:4 в КА реагировала с соком здоровых растений. Это происходило потому, что не была достаточно хорошо отработана методика получения очищенного препарата вируса, используемого в качестве иммуногена.

Позже вирус нами был выявлен на растениях огурца в закрытом грунте.

#### Вирус мозаики томата *Tomato mosaic virus*

Вирус впервые обнаружен в США в 1909 г. (цит. по: Huttanga, Rust, 1985). Он имеет частицы размером 300 нм × 18 нм. По всем своим основным таксономическим

характеристикам вирус мозаики томата (ВМТо) близок к вирусу табачной мозаики. Японские исследователи провели секвенирование генома томатного штамма ВМ и сравнили его с геномом обычного штамма ВМ (Ohno et al., 1984). Оказалось, что исследуемый ими изолят следует отнести к самостоятельному вирусу.

Основные растения, которые поражаются ВМТо, – из семейств *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Scrophulariaceae* (Hollings, Huttanga, 1976). Диагностические виды, реагирующие локальными некрозами, – *N. tabacum* sv. White Barley, *N. rustica*, *P. hybrida*. Но самый большой урон вирус наносит растениям томатов различных сортов и гибридов, которые выращиваются как в открытом, так и защищенном грунте. Вирусом поражаются не только растения томатов, но и их плоды. По типам симптомов на томатах при заражении ВМТо существует несколько названий заболеваний – мозаика томатов, стрик томатов и внутренний некроз плодов томатов. Наиболее характерным симптомом вирусного поражения на растениях томатов является пестрая расцветка листьев различных оттенков – от бледно-зеленой пятнистости до ярко-желтой мозаичности. В условиях повышенной влажности и сравнительно низкой температуры на мозаичных растениях томатов развиваются симптомы нитевидности листьев. Кроме того, при позднем инфицировании растений вирусом или при недостатке света, слабой аэрации, повышенной влажности почвы у плодов томатов развивается внутренний некроз. Типичный признак проявления болезни, вызываемой ВМТо на плодах томатов, – образование отмерших некротических участков коричнево-серого и коричнево-бурого цвета. Некротическая ткань при сильном поражении просвечивается через бесцветный эпидермис. Некротизация ткани начинается вблизи прикрепления плодов к плодоножке. Отмершая ткань жесткая и корковая по структуре. В отдельных случаях при поражении растений томатов вирусом симптомы некроза на плодах заметны только при их разрезании. Нередко ВМТо присутствует в растениях в смешанной инфекции с другими вирусами, обычно с ХВК, вызывая симптомы двойного стрика: образование на листьях, стеблях, черешках и плодах продольных, обычно поверхностных, некротических пятен и полос. При сильном развитии стрика верхушка растения полностью засыхает и отмирает. Аналогичные поражения могут быть вызваны также некротическими штаммами ВОМ. Одинарный стрик развивается при неблагоприятных условиях роста и развития растений томата, зараженного ВМТо, и обусловлен резкими перепадами температуры воздуха, недостатком освещения, избытком азотного питания (Власов, Самсонова, 2005).

ТТИ – 85–90 °С, ПРС –  $10^{-5}$ – $10^{-7}$ , ПСИ – 500 сут (Huttanga, Rust, 1985).

Вирус имеет антигенное родство с другими видами рода *Tobamovirus*.

Вирус передается семенами томата (до 90 % случаев), которые могут иметь темные некротические пятна на поверхности, а также контактным путем во время ухода за растениями. Первичными очагами инфекции в условиях как открытого, так и закрытого грунта являются единичные больные растения, появившиеся при передаче ВМТо семенами. Для защищенного грунта выведены устойчивые к ВМТо гибриды томатов. Установлено, что резерваторами вируса из сорных и дикорастущих растений являются паслен черный и повилыка, то есть те растения, которые наиболее часто



встречаются в посадках томатов. Вирус не переносится насекомыми, сохраняется в почве.

На юге Приморского края этот вирус был выделен из растений томатов, выращиваемых в теплицах. Сначала мы считали, что вирус, выделенный из томатов, является ВТМ. Затем его выделили как самостоятельный вирус мозаики томата главным образом по симптомам проявления на растениях томатов и их плодах, хотя различия по другим критериям идентификации, как показали наши исследования и литературные данные, между ВТМ и ВМТо минимальны.

Дальневосточный изолят ВМТо в зависимости от экологических условий (влажность воздуха, освещение, температура, фазы роста в момент заражения) вызывал различные симптомы заболевания в виде хлоротичной мозаики со светло- или темно-зелеными вздутиями и сильной деформацией верхних листьев растений. Плоды отдельных растений томатов были деформированы и имели внутренний некроз. Это чрезвычайно контагиозный вирус, он передавался при проведении технических операций, легко выдерживал высокие температуры, длительное время сохранялся в почве и мог распространяться семенами растений семейства Пасленовые.

### Вирус табачной мозаики *Tobacco mosaic virus*

Вирус табачной мозаики (ВТМ) является типовым видом рода *Tobamovirus*. Это самый распространенный и изученный в настоящее время фитопатогенный вирус. С ВТМ связано начало вирусологии как науки в 1892 году (Ивановский, 1892). Не одно десятилетие ВТМ служит экспериментальной моделью в молекулярной биологии. Этот вирус представляет собой наиболее простую форму жизни, удобную для изучения основных свойств живой материи. Вирус выгодно отличается от других вирусов растений благодаря своей стабильности (сохраняется в нестерильных экстрактах в течение 50 лет) (Silber, Burk, 1965) и способности накапливаться в растении-хозяине от низкой до высокой концентрации (в зависимости от изолята) – 8–460 мг/кг (Гнутова, 1993).

**Свойства вирионов. Морфология.** Вирионы ВТМ представлены жесткими палочками длиной 300 нм и шириной 18 нм, состоящими из белковой оболочки (капсида) и заключенной в ней инфекционной РНК. Капсид вириона состоит из 2130 ( $\pm 2\%$ ) идентичных белковых субъединиц, плотно упакованных в виде спирали, шаг которой равен 2,3 нм.

**Белки.** Белковая субъединица представляет собой молекулу с м.м. 18 кДа, состоящую из 158 аминокислот, последовательность которых в полипептидной цепи полностью установлена (Tsugita et al., 1960). Одноцепочечная РНК ВТМ, имеющая м.м. 2,05 мДа, уложена в вирионе в спираль с шагом 2,3 нм и расположена в желобке, образованном белковыми субъединицами.

**Организация генома и репликация.** Репродукция вируса происходит в клетке, после проникновения в которую вирионы подвергаются разборке (депротеинизации).

По мнению некоторых авторов (Cocking, Pojnar, 1969), депротеинизация ВТМ состоит в гидролизе белка вирионов. Получены данные о так называемом контрансляционном механизме депротеинизации ВТМ (Wilson, 1984; Shaw et al., 1986).

По современным представлениям (Леднева, 1982; Atabekov, Taliensky, 1990; Dawson, Lehto, 1990), монопартирный геном ВТМ несет информацию для синтеза четырех полипептидов: 126, 180, 30 и 18 кДа. Матрицей для синтеза белков 126 и 180 кДа служит вирионная РНК. Установлено, что эти белки ответственны за репликацию вирусного генома и входят в РНК-зависимый РНК-полимеразный комплекс (РНК-репликазу). Имеются данные, что в состав РНК-репликазы тобамовирусов наряду с вирусными могут входить и клеточные компоненты (Dawson, Lehto, 1990). Образовавшаяся вирусспецифическая РНК-репликаза осуществляет репликацию вирусной РНК.

В отличие от белков с м.м. 126 и 180 кДа, два других белка – оболочечный (18 кДа) и транспортный (30 кДа) – продуцируются в результате трансляции соответствующих субгеномных РНК (Леднева, 1982; Atabekov, Taliensky, 1990; Dawson, Lehto, 1990).

После синтеза вирусных РНК и капсидного белка происходит процесс сборки вирионов, который подразделяют на две стадии: инициации и элонгации (Matthews, 1981; Butler, 1984). Первые зрелые частицы ВТМ появляются через 6 мин после начала сборки (Matthews, 1981).

Следует отметить, что взаимодействие вирионной РНК с капсидным белком и молекул белка между собой отличается высокой специфичностью (Тальянский, 1984; Butler, 1984). Однако возможность фенотипического смешивания штаммов ВТМ (Тальянский, 1984) и образование псевдовирионов – хлоропластных ДНК-транскриптов, «одетых» оболочечным белком ВТМ, указывают на ее относительность (Rochon, Siegel, 1984).

ВТМ может образовывать паракристаллы или жидкие кристаллы, в которых соседние вирусные частицы очень хорошо пригнаны друг к другу. При высыхании паракристаллов расстояние между центрами частиц становится равным 15,2 нм, во влажном теле – 17,5 нм, что приблизительно равно расстоянию между наружными концами субъединиц (Лурия, Дарнелл, 1970).

При обработке вирионов ВТМ слабой щелочью происходит освобождение белкового компонента вируса в частично агрегированной форме, который носит название А-белка. Этот белок может вновь соединяться с РНК вируса, формируя палочки, обладающие инфекционностью (Butler, 1984). Реагрегация А-белка с последующим образованием палочек со спиральной симметрией происходит даже в отсутствие РНК; в результате могут возникать плоские диски (Markham et al., 1964). Процесс реагрегации белка ВТМ представляет собой явление, подобное кристаллизации, и сборка вирусных белковых субъединиц в спиральные капсиды отражает свойства, присущие самим этим субъединицам (Лурия, Дарнелл, 1981).

Капсиды ВТМ обладают относительно жесткой структурой. Это показывает, что связи между субъединицами в последовательно расположенных витках спирали довольно прочные. Коэффициент седиментации ВТМ равен 194 S.



**Биологические свойства.** Симптомы, вызываемые вирусом у зараженных растений, например табака, могут выглядеть как пестрая расцветка листьев разных оттенков и разного рисунка, что зависит от заражения определенным штаммом ВТМ. Известны зеленая (обыкновенная или типичная) и желтая мозаика, кольцевая некротическая пятнистость. Более подробно симптомы мы опишем чуть ниже, так как механизмом их образования занималось довольно большое число исследователей.

ВТМ – один из самых стабильных вирусов. ТТИ – от 80 °С до 95 °С и выше, ПРС –  $10^{-6}$ – $10^{-10}$ , ПСИ – от нескольких месяцев до нескольких лет. Вирус может длительное время сохраняться в сухих растениях (Мэтьюз, 1973; Молдован, 1979).

**Передача.** В природе ВТМ в основном передается при контакте больного растения со здоровым, изредка семенами (Щербинин, Щербинина, 1975), вегетативным размножением, через почву (Виллемсон, 1994), прививками, а также в результате сельскохозяйственной деятельности человека. В последние годы появились данные о том, что ВТМ может переноситься на большие расстояния туманами и облаками (Castello et al., 1995 a,b). Кроме того, в связи с большой стойкостью и контагиозностью возможно заражение растений культурной и дикой флоры через корни в почве, загрязненной остатками больных растений. Считается, что вирус не распространяется насекомыми и пылью (Brunt et al., 1997 b). Однако некоторые авторы не разделяют этого мнения (Stoenescu, 1984; Виллемсон, 1994).

**Распространение ВТМ в растении.** К настоящему времени различают два типа распространения вирусной инфекции в растениях – медленный транспорт вируса из клетки в клетку и быстрый – по проводящей системе на большие расстояния (Esau, 1968; Мэтьюз, 1973; Журавлев, 1979; Atabekov, Dorokhov, 1984; Малиновский 1998).

Медленный межклеточный транспорт вируса осуществляется через плазмодесмы (Esau, Cronshaw, 1967; Esau, 1968). Долгое время полагали, что такой транспорт вирусов является пассивным процессом, при котором вирусные частицы, накапливаясь в данной клетке, диффундируют в соседние. Однако в настоящее время установлено (Atabekov, Dorokhov, 1984; Zaitlin, Hull, 1987; Atabekov, Taliansky, 1990; Дорохов, 1994), что межклеточный транспорт вирусов является вирускодируемым процессом, осуществляемым с помощью транспортных белков (ТБ). Показано, что транспортная функция ВТМ обеспечивается вирусным белком 30 кДа (Atabekov, Morozov, 1979; Leonard, Zaitlin, 1982).

ТБ могут влиять на транспорт вируса, «открывая» плазмодесмы путем их модификации (Leonard, Zaitlin, 1982; Atabekov, Dorokhov, 1984) или увеличивая их число и размеры (Shalla et al., 1982; Sulzinski, Zaitlin, 1982). Функция ТБ также может заключаться в подавлении защитных механизмов клетки, в результате чего обеспечиваются репродукция и транспорт вируса (Atabekov, Dorokhov, 1984).

Дальний транспорт вирусов происходит по проводящим тканям растений. Вирус из паренхимных клеток может попадать в ситовидные элементы флоэмы через плазмодесмы, затем движение его осуществляется вместе с ассимилятами через поры в ситовидных пластинках (Esau, 1968). Из ситовидных трубок транспортируемый вирус посредством плазмодесм поступает в паренхимные клетки, что приводит к вторичному инфицированию листьев и системному поражению растения.

В соответствии с литературными данными, дальний транспорт многих вирусов, в том числе и ВТМ, происходит посредством капсидного белка (Реунов, 1989, 1999). Транспортная функция вирусов осуществляется только в определенных видах растений и, таким образом, определяет круг растений-хозяев (Taliansky et al., 1982 b; Тальянский, 1984).

В какой форме вирус транспортируется по растению, существуют различные мнения. Предполагалось (De Zoeten, 1981), что инфекция может распространяться в виде зрелых вирионов, а также связанных с мембранами (+)-РНК, (-)-РНК либо репликативных комплексов. Некоторые данные (Atabekov, Dorokhov, 1984) свидетельствуют, что транспортной формой вирусов могут быть вирусспецифические РНК-частицы (вРНК).

**Симптомы поражения растений ВТМ.** Заражение растений-хозяев ВТМ сопровождается развитием у них различных симптомов, зависящих от типа взаимодействия растения и вируса (Молдован, 1979). При совместимости партнеров у растения развивается системная инфекция. В этом случае симптомы проявляются в виде крапчатости, штриховатости, деформации листьев, различных мозаик с чередованием светлых и более темных участков листа (Gibbs, 1977). Иногда вирус вызывает некроз стеблей, черешков и плодов растений (Hollings, Nutting, 1976).

Среди системно зараженных растений можно выделить толерантные (выносливые) растения, в которых вирус накапливается в значительных количествах, но симптомы выражены слабо (Clarke, 1986).

Другой тип взаимодействия – несовместимость растения и вируса. При этом растения отвечают на вирус реакцией сверхчувствительности (СВЧ), в результате которой в местах внедрения патогена формируются локальные некрозы (Holmes, 1932; Малиновский, 1998). Как правило, эта реакция приводит к блокированию вируса в зонах некрозов, и инфекция не распространяется по растению, то есть становится локальной. Известно (Sela, 1981), что реакция СВЧ и локализация ВТМ у рода *Nicotiana* обуславливаются двумя генами – N и N', происходящими соответственно от табака клейкого *N. glutinosa* и лесного *N. sylvestris* Speg et Comes. Причем N-ген эффективен в отношении всех известных штаммов ВТМ, а N'-ген – лишь в отношении некоторых из них. При повышенных температурах (30 °C) механизмы, блокирующие вирус у локально реагирующих растений-хозяев, подавляются и инфекция трансформируется в системную (Loebenstein, 1972).

Развитие симптомов у растений происходит лишь при размножении и распространении в них вирусов. Вместе с тем корреляция между накоплением вирусов и суровостью симптомов наблюдается далеко не всегда, например при заражении табака маскированным штаммом ВТМ (этот штамм размножается в той же степени, что и дикий патогенный тип, но не индуцирует видимых симптомов на растении). В то же время есть штаммы ВТМ, а также некоторые мутанты, которые вызывают суровые симптомы желтой мозаики, но накапливаются в меньшей степени, чем обычный (типичный) штамм (Van Loon, 1987).

Несмотря, однако, на отмеченные особенности в развитии вирусного патогенеза, полагают, что репродукция и транспорт вируса в растении влияют на формирование

симптомов  
ремещен  
оболочеч  
детермина

Таска  
щий у раст  
U1, индуш  
5770 и 612  
зиции 19  
et al., 1989

его способ  
штамм ВТ  
в результ  
замена про  
формирова

Дефе  
портном б  
то время к

Заме  
на симпто  
стях таба

Воспр  
развитие с  
руемые бе  
аномальн

к индушир  
Учас  
осуществи

другими  
лы капсид  
стов, и с  
et al., 1989

Кру  
ражает бо  
жаемых В  
по: Zaitfi  
русом рас

Установл  
ВТМ (Ген  
По

ры (Васи  
Романова



симптомов, а соответственно и вирусные белки (ответственные за репликацию и перемещение вирусов) вовлекаются в патогенез. Действительно, было показано, что и оболочечный, и транспортный, и репликационный белки ВТМ могут выполнять функции детерминант патогенности (Реунов, 1999).

Также получены данные (Banerjee et al., 1995), что мутант ВТМ *YSI/1*, вызывающий у растений табака суровую желтую мозаику, отличается от родительского штамма *U1*, индуцирующего в том же хозяине обычную мозаику, нуклеотидами в позициях 5770 и 6127, а следовательно, соответствующими им аминокислотами: аспарагин в позиции 19 заменен валином, серин в позиции 138 – фенилаланином. Установлено (Saito et al., 1989), что изменения в оболочечном белке томатного штамма ВТМ *L* влияют на его способность вызывать образование локальных некрозов у *N. sylvestris*. Обычный штамм ВТМ *U1*, как известно, не вызывает СВЧ-ответ у растений с *N'*-геном. Однако в результате точечной мутации в гене оболочечного белка в позиции 20 происходит замена пролина на лейцин, и, как следствие, модифицированный штамм индуцирует формирование локальных некрозов у *N. sylvestris* (Culver, Dawson, 1989).

Дефектный по транспортной функции мутант ВТМ *Ni 2519*, у которого в транспортном белке глицин заменен на аспарагин, вызывает при 32 °С у *N. sylvestris* СВЧ, в то время как родительский штамм – системную реакцию (Taliensky et al., 1982 а).

Замены в 8 позициях гена, ответственного за репликационный белок 126 кДа, влияли на симптомы, индуцированные маскированным и обычным штаммами ВТМ на листьях табака настоящего сорта Ксанти *N. tabacum* L. cv. Xanthi (Shintaku et al., 1996).

Вопрос о том, каким образом вирусные детерминанты патогенности вызывают развитие симптомов болезней у растений, остается неясным. Возможно, вирускодируемые белки способны влиять на функционирование генов хозяина, что приводит к аномальным изменениям в процессах роста и развития растений, а соответственно и к индуцированию симптомов.

Участие детерминант патогенности в развитии вирусных болезней, возможно, осуществляется не только в результате их действия на геном растения-хозяина, но и другими путями. Есть данные (Reinero, Beachy, 1986; Banerjee et al., 1995), что молекулы капсидного белка могут быть ассоциированы с мембранами тилакоидов хлоропластов, и сделано предположение о связи этого факта с развитием симптомов (Hodgson et al., 1989; Reinero, Beachy, 1989).

**Круг растений-хозяев.** ВТМ является одним из вирусов, который в природе поражает большой круг растений из различных семейств. Первым привел список поражаемых ВТМ растений Ф. Холмс, в него он включил 199 видов из 30 семейств (цит. по: Zaitlin, Israel, 1975). Спустя 11 лет круг экспериментально поражаемых этим вирусом растений расширился до 350 видов из 35 семейств (Van Regenmortel, 1986). Установлено, что дикая и сорная растительность является постоянным источником ВТМ (Гольдин, 1948; Щербинин, Щербинина, 1975).

По литературным данным, вирус в агроценозах поражает овощные культуры (Васильева, 1976; Власов, 1992; Толкач и др., 1992), картофель (Ларина, 1978; Романова, Леднева, 1989), сою (McDaniel et al., 1995), декоративные культуры (Чуян,

Стрекозова, 1985; Навалинскене, 1994; Толкач, 1995; Elliot et al., 1996), кустарники (Бойко, 1976), садовые (Okugama, Kitayawa, 1974; Candresse et al., 1996), древесные (Lapa, Agrios, 1974), травянистые растения (Щербинин, Щербинина, 1975) и другие культуры.

Диагностическими видами для типичного ВТМ являются растения *N. tabacum* cvs. Samsun, White Burley и *N. sylvestris* Speg. et Comes, которые на инфекцию отвечают системной реакцией. В то же время *N. glutinosa* и *N. tabacum* cv. Xanthi, фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris* L. cv. Perlička и марь квиноа *Ch. quinoa* реагируют на заражение вирусом только образованием локальных некрозов (Brunt et al., 1997 b).

**Цитопатология.** При исследовании пораженных ВТМ растительных клеток в световом микроскопе выявлено два типа цитоплазматических включений (Christie, Edwardson, 1977). К первому типу относятся кристаллические включения, которые состоят преимущественно из вирусных частиц (гексагональные, нитевидные, игло-видные паракристаллы). Второй тип включений представлен X-телами (аморфные, зернистые, вакуолярные, амебовидные, веретенообразные). В их составе наряду с вирионами были обнаружены нормальные компоненты клетки (рибосомы, митохондрии, диктиосомы, эндоплазматический ретикулум и др.).

Характерными признаками X-тел, индуцированных ВТМ, являются гранулярные включения и филаменты, состоящие из трех или большего количества микротрубочек диаметром около 24 нм (Esau, 1968). На поздних стадиях инфекции филаменты распадаются на отдельные трубки. С помощью метода меченных коллоидным золотом антител показано (Hills et al., 1987), что ВТМ-специфические филаменты состоят из белка 126 кДа (компонента вирусной РНК-репликазы). В гранулярных включениях Т. Сайто с соавт. (Saito et al., 1987) выявили белки 130 и 180 кДа; по их мнению, эти включения являются местом синтеза геномной и субгеномной РНК ВТМ.

**Видовое разнообразие.** В отечественной и зарубежной литературе описано большое число разнообразных изолятов и штаммов ВТМ. Как уже было отмечено выше, чаще всего вирусы в процессе репродукции дают потомство, подобное родительским частицам. Однако в результате мутаций образуются новые формы вируса. Иногда подобные формы появляются в результате замены лишь одного пуринового или пиримидинового основания в молекуле РНК. Это приводит к превращению данного триплета в триплет, кодирующий другую аминокислоту, включающуюся в синтезирующийся белок (Метьюз, 1973). Так появляются штаммы вируса, различающиеся не только по патогенности, но и по многим другим свойствам. Уже в 60-х годах были проведены исследования, позволившие установить полную последовательность аминокислот в полипептидных цепях капсидного белка обычного ВТМ и ряда его природных штаммов и искусственно полученных мутантов (Anderer et al., 1960; Tsugita et al., 1960; Wittmann, Wittmann-Liebold, 1966). Эти классические исследования внесли важный вклад в изучение генетического кода и в понимание химических основ мутации.

К началу 70-х годов прошлого столетия было известно около 200 штаммов ВТМ (Шаскольская и др., 1974), а через несколько лет, к концу 80-х, – уже более 300 (Nagai et al., 1987), и с каждым годом, благодаря выявлению новых изолятов, их количество



увеличивается. Установлено, что дикая и сорная растительность является более или менее постоянным источником ВТМ. Мак-Нейлл (MacNeill, 1962) еще в середине прошлого века предложил штаммы ВТМ разделить на две группы – табачные и томатные. При заражении растений махорки *N. rustica*, табака крылатого *N. alata* Linket Otto, петунии гибридной *P. hybrida* Vilm. и табака лесного *N. sylvestris* томатные штаммы индуцируют образование локальных некрозов в отличие от табачных, которые вызывают системное поражение *P. hybrida* и *N. sylvestris* либо вначале формируют локальные некрозы, а затем вызывают системную инфекцию. На растениях томатов табачные штаммы встречаются в единичных случаях, в то время как томатные – доминируют. До сих пор многие вирусологи при идентификации штаммов ВТМ используют это разделение на две группы.

Типичным или обычным штаммом считают тот табачный штамм ВТМ, который вызывает на инокулированных листьях табака клейкого *N. glutinosa* локальные поражения, а на *N. tabacum* различных сортов (кроме сорта Ксанти) – системную реакцию: мозаичную пятнистость, темно-зеленую пузырчатость и другие симптомы. На некоторых сортах фасоли обыкновенной при заражении этим штаммом ВТМ образуются мелкие красноватые локальные пятна (Смит, 1960).

Кроме этих двух групп штаммов ВТМ в литературе описаны и другие, которые отличаются по экспериментальному кругу растений-хозяев, симптоматологии, внутриклеточным включениям, по физическим свойствам вирионов, физико-химическим характеристикам структурных вирусных белков и наличию у последних штаммоспецифических эпитопов. Описаны подорожниковые штаммы ВТМ. Они на инокулированных листьях табака виргинского вызывают многочисленные локальные поражения (Holmes, 1941; Was, Chrzanowska, 1971; Prochazkova, 1977), некротические (Amparo, 1972; Tosic, Videnov, 1981; Толкач, 1995), аукуба-мозаичные – вызывающие образование местных некрозов на инокулированных листьях *N. sylvestris* и *N. tabacum* без дальнейшего распространения вируса по растению (Смит, 1960; Сердеченко, 1974; Молдован, 1979) и др. Некоторые штаммы ВТМ в процессе эволюции довольно сильно специализировались и поэтому заражают очень узкий круг растений-хозяев. К ним относятся орхидные штаммы ВТМ, заражающие растения только из семейства орхидных (Kado et al., 1968), огуречные (Проценко, 1977) и суровый штамм из кактуса (Giri, Chessin, 1975).

Известно, что особенности взаимодействия штаммов с растением-хозяином обусловлены свойствами их структурных белков и РНК (Метьюз, 1973). Исследование влияния различных штаммов на состояние растения-хозяина – перспективный путь для изучения механизмов вирусного патогенеза и защитных реакций растений.

Для характеристики штаммов ВТМ необходимо всестороннее исследование их с помощью различных методов: физико-химических, иммунохимических, цитологических. Физико-химические и электрофоретические методы исследования позволяют изучать структурные белки. С помощью иммунохимических методов выявляется антигенная специфичность капсидных белков не только вирусов, но и их штаммов. Благодаря специфичности антитела реагируют только с теми эпитопами, в ответ





личество штаммов для его типового представителя – ВТМ (Nagai et al., 1987). Это свидетельствует о том, что род еще достаточно молод, и дальнейшее его пополнение, возможно, произойдет не за счет новых видов, а за счет видового разнообразия ВТМ (Gnutova, Tolkach, 1998).

Таким образом, при попытке отнести штамм к определенной группе внутри вида не только ВТМ, но и других вирусов растений возникают две взаимосвязанные задачи: определение различий между штаммами внутри данного вида (вируса) и установление степени родства между ними. Для этого исследуют такие свойства, которые отличаются большой изменчивостью: спектр хозяев, симптомы, аминокислотный состав капсидного белка и антигенную специфичность.

Подводя итог изложенным литературным данным по биологическому тестированию, морфологии, цитопатогенным, физическим свойствам, таксономии ВТМ и его штаммов, следует подчеркнуть большую значимость подобных исследований как в теоретическом, так и в практическом плане. Исследование штаммов расширяет существующие знания о разнообразии вирусов, циркулирующих в природе. Изучение штаммовых особенностей поможет в разработке методов защиты растений от наиболее распространенных и вредоносных штаммов ВТМ, которые наносят большой экономический ущерб растениям культурной и дикой флоры.

#### Дальневосточные изоляты ВТМ из декоративных и овощных культур

В Приморье в 80-е годы прошлого столетия было выявлено 9 изолятов ВТМ из таких растений, как зорька халкедонская *L. halcedonica*, белена черная *H. niger*, табак душистый *N. affinis*, петунья гибридная *Petunia hybrida* Vilm. (Крылов и др. 1980), картофель *Solanum tuberosum* (Романова, Леднева, 1989), ирис гибридный *Iris hybrida* (Толкач и др., 1988), перец однолетний *Capsicum annuum* (Толкач и др., 1992; Толкач, 1995) и 2 изолята ВТМ из нарциссов *Narcissus* sp. L. – ВТМ-216 и ВТМ-412 (Чуян, Стрекозова, 1985).

**Некротический штамм ВТМ.** Перцевый некротический изолят ВТМ. Соком изолята ВТМ из перца сорта Миг удалось заразить 18 тест-растений из 38 испытуемых. У инокулированных видов *Capsicum* вирус вызывал различные симптомы заболевания (рис. 109).

Соя культурная, календула лекарственная и цинния изящная поражались вирусом бессимптомно. На остальных десяти видах вирус вызывал реакцию только местного характера.

Изолят ВТМ из перца однолетнего (ВТМпн) имел родственные эпитопы со всеми изучаемыми нами изолятами ВТМ, но наибольший процент идентичных эпитопов капсидных белков по результатам РИЭФ отмечен с изолятом из растений нарцисса (ВТМ-412). По данным В.Ф. Толкач (1995), штамм отличался от остальных прежде всего тем, что не вызывал видимых симптомов заражения на табаке настоящем *Nicotiana tabacum* cv. Samsun и не заражал томат съедобный *Lycopersicon esculentum*

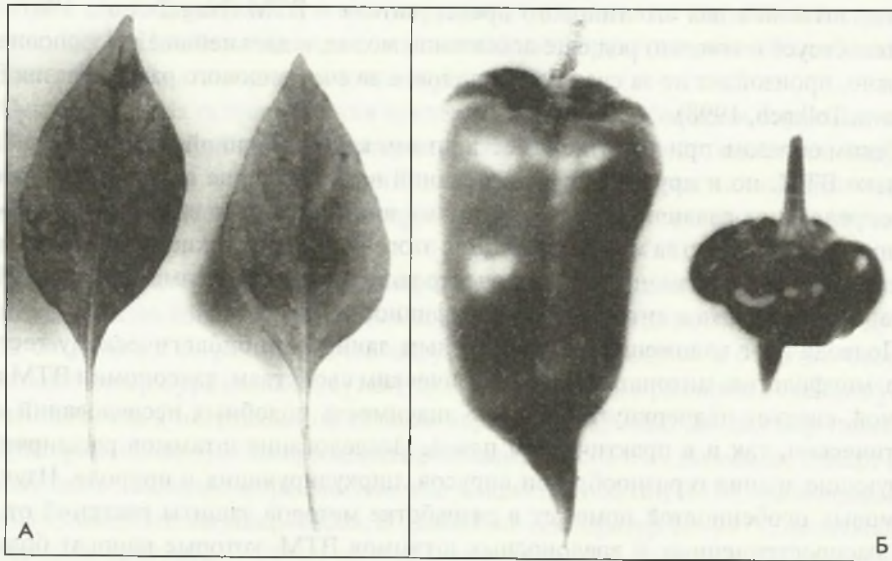


Рис. 109. Симптомы заболевания, вызванные ВТМ на перце. А – локальный кольцевой некротический узор на листьях, Б – мелкий уродливый плод (справа), контроль (слева)

Mill., но вызывал на большинстве тест-растений реакцию локально-некротического характера. Во-вторых, дальневосточный ВТМпн был термостабилен (ТТИ – 95 °С) по сравнению с обычным (типичным) (ТТИ – 90–92 °С) и другими дальневосточными изолятами (ТТИ – 86–92 °С). Поэтому ВТМпн нельзя было отнести ни к табачным штаммам, ни к томатным. Согласно литературным данным и результатам наших исследований этот изолят являлся некротическим штаммом ВТМ из группы некротических штаммов вируса.

ВТМпн использовался для изучения защитных механизмов растений против вирусов (Малиновский, 1998). Автор нашел причину отсутствия симптомов на растениях табака, инокулированных этим штаммом. Во-первых, исследователем была установлена низкая скорость транспорта этого штамма ВТМ в растении из-за слабой репродукции и, во-вторых, было показано, что ВТМпн может заражать протопласты клеток табака cv. Samsun, но в растении табака вирус плохо размножается и транспортируется, поэтому не вызывает симптомов заболевания. У растений табака cv. Samsun развивается толерантная реакция в ответ на заражение ВТМпн.

### Изоляты группы обычных (табачных) штаммов ВТМ

*Изоляты ВТМ из декоративных растений.* В клетках табака и растений других видов, инфицированных этими изолятами ВТМ, наблюдались характерные внуклеточные вирусные включения, чаще всего с индивидуальными особенностями

(рис. 110)  
Moore, и  
ние кру  
не отлича  
этого сер  
основани  
растений  
стинки, в  
веретени  
ровал к

Сред  
белены,  
только у  
клейкого  
ма ВТМ  
Оси  
ке сорти  
стую мо  
Петуна  
характер  
характер  
Ката  
морская  
иногда  
шлого ст  
Леднева



(рис. 110). Так, изолят ВТМ, обнаруженный на растениях табака душистого *N. affinis* Мооге, индуцировал в клетках листа, стебля и в эпидермисе лепестков цветка образование крупных гексагональных кристаллов и многоугольных пластинчатых включений, не отличающихся по морфологии от включений, формирующихся у растений табака этого сорта при заражении их обычным штаммом ВТМ. В эпидермальных клетках основания волосков листьев табака, инокулированного изолятом ВТМ, выделенным из растений белены черной *Hyoscyamus niger* L., образовывались тонкие слоистые пластинки, в то время как в верхних клетках волосков встречались вирусные включения веретеновидной формы. Изолят из зорьки халкедонской *Lychnis halcedonica* L. формировал в клетках пристеночные тонкие кристаллы (Гнутова и др., 1980; Толкач, 1995).

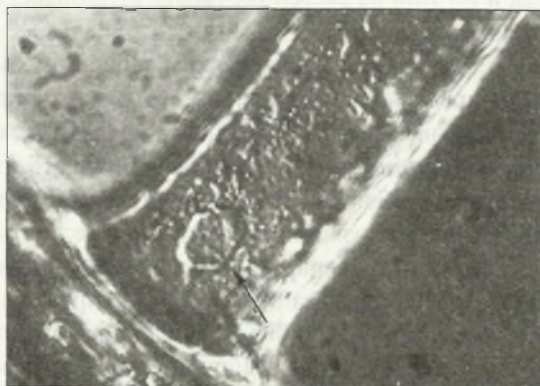


Рис. 110. Включение (показано стрелкой), индуцируемое изолятом ВТМ из ириса

Сравнительное изучение симптомов, вызываемых изолятами ВТМ из зорьки, белены, петунии, табака душистого, проводили на 14 видах тест-растений. Из них только у 4 – мари гигантской, дурмана обыкновенного, гомфрены головчатой и табака клейкого – были получены однотипные симптомы, характерные для обычного штамма ВТМ.

Основные различия между изолятами прослеживались по симптомам на табаке сортов Самсун, Ява, лесном и петунии гибридной. У табака сорта Самсун простую мозаику системного характера вызывали изоляты из белены и обычный штамм. Петуниевый изолят проявлялся кольцевыми пятнами как системного, так и местного характера. Остальные изоляты вызывали образование хлоротичных пятен местного характера.

*Картофельный изолят ВТМ.* Во время фитосанитарного мониторинга в Приморском крае с помощью специфической антисыворотки против ВТМ в реакции КА иногда выявлялся вирус на некоторых растениях картофеля. В конце 80-х годов прошлого столетия ВТМ идентифицировали из растений сорта Филатовский (Романова, Леднева, 1989). Изолят ВТМ вызывал симптомы ярко-зеленой мозаики на листьях.

После трех лет выращивания этого материала в тепличных условиях характер симптомов не изменялся. ТТИ составила 90–93 °С, ПРС –  $10^{-7}$ – $10^{-9}$ . ПСИ – от нескольких месяцев до года и выше. По характеру симптомов и биологическим свойствам вирионов его отнесли к группе табачных (обычных) штаммов. Изолят ВТМ из картофеля отличался высокой иммуногенной и антигенной активностью.

Все изученные изоляты легко передавались механически.

Дальневосточные изоляты ВТМ значительно различались по термоустойчивости. Например, изолят из нарцисса (ВТМ-412) имел ТТИ 90 °С, а из ириса – 80 °С и сохранялся при комнатной температуре не более 2 мес; из перца однолетнего – 95 °С и сохранялся несколько месяцев в комнатных условиях. Изолят из растений нарцисса (ВТМ-412), так же, как и ВТМпн на растениях табака св. Samsun, не вызывал никаких симптомов, что не характерно для ВТМ.

Итак, по реакции тест-растений и физическим свойствам дальневосточные изоляты ВТМ из растений ириса, нарцисса (ВТМ-216) и картофеля были отнесены к группе табачных (обычных) штаммов, а из перца – к некротическим штаммам ВТМ.

**Физико-химические и антигенные свойства.** Вирус (18 изолятов ВТМ) накапливали в растениях табака св. Samsun. Растения инокулировали на стадии 4–5 листиков, и на 14-й день после инокуляции свежесорванные листья использовали для получения очищенного вирусного препарата по методу В.К. Новикова с соавт. (1984) в нашей модификации. Для гомогенизации материала применяли 0,05 М фосфатный буфер, рН 7,4–7,6, с добавлением 0,005 М этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) и 0,1–0,2 % 2-меркаптоэтанола. Вирусосодержащую суспензию осветляли смесью хлороформа (1/8 от объема) и бутанола (8 %) с дальнейшим доведением рН суспензии до 7,6–7,8 (KOH или NaOH). Для удаления фракции крупных клеточных компонентов сока использовали низкоскоростное центрифугирование (8000 г × 20 мин). Осаждение вируса осуществляли добавлением полиэтиленгликоля (ПЭГ) в количестве 4 % от объема и 0,3 М NaCl. Смесью выдерживали 1,5 ч при 4 °С, после чего центрифугировали (16000 г × 30 мин). Далее проводили трехкратное экстрагирование осадка в 0,05 М боратном буфере, рН 7,6 (6000–8000 г × 10 мин). Окончательным этапом очистки вируса являлось дифференциальное центрифугирование через сахарозную подушку (24000 г × 2,5 ч). Полученные осадки растворяли в минимальном количестве 0,01 М боратного буфера, рН 8,0–8,5, и центрифугировали при 8000–10000 г.

Концентрацию вируса в очищенном препарате определяли спектрофотометрически с использованием для ВТМ коэффициента экстинкции  $E = 2,7$  (Zaitlin, Israel, 1975) по формуле

$$C = \frac{E_{260} \cdot \text{разведение}}{2,7}$$

Выход вируса для каждого из изучаемых штаммов и изолятов ВТМ был индивидуален (табл. 48).

Была проведена сравнительная характеристика антигенной специфичности дальневосточных изолятов и штаммов ВТМ, идентифицированных в различных регионах бывшего СССР: фибриллярный, цифомандровый, казахский, обычный, подорожничко-

Изолят
Петуниевый
Казахский
Ядерный «Т»
Картофельный
Нарциссовый
Зорьки
Обычный
Ириса
Душистый табак
Подорожничко-
Цифомандровый
Ядерный «О»
Белены
Фибриллярный
Петлевидный
Нарциссовый
ОМ
Перцевый

вый, петлевидный, цифомандровый, генетики г. М.

Ко всем штаммам ВТМ введены антигены, в том числе в воротки листьев, в введении антител в крови иммунизированных растений.

Идентификация в лении концентрированной массы табачных листьев, срок хранения ВТМ отмытых листьев, чьих специфических антигенов при постановке иммунохимических реакций.

Результаты исследований РИЭФ (рис. 1) антител к вирусам



Концентрация ВТМ в препаратах и титр специфических антител  
в моноштаммовых антисыворотках по результатам РДД

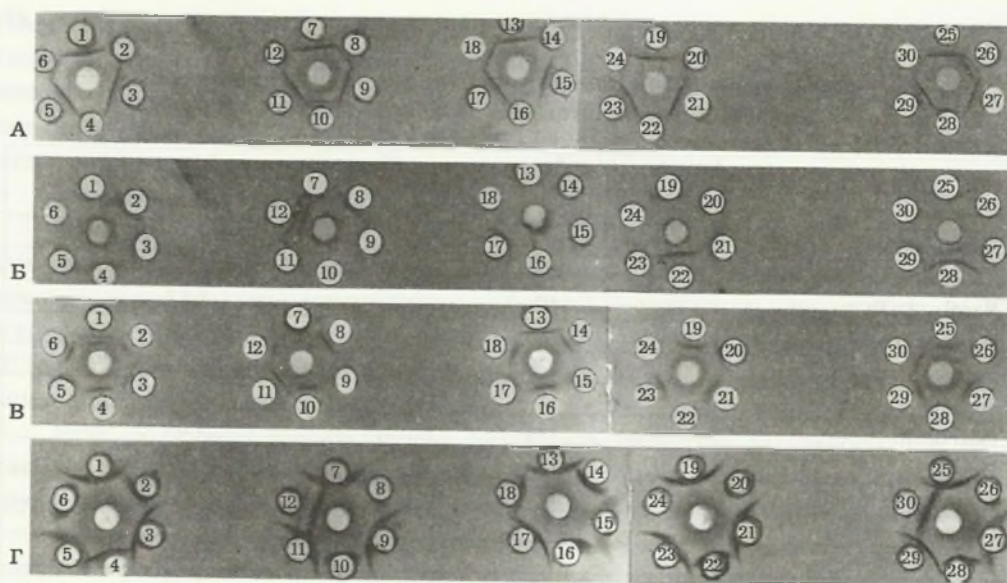
Изолят, штамм	Выход вируса (мг) на 1кг листьев	Максимальный титр штаммспецифических антител
Петуниевый	461	1:32
Казахский	406	1:128
Ядерный «Т»	92	1:32
Картофельный	186	1:2048
Нарциссовый-216	170	1:32
Зорьки	154	1:32
Обычный	144	1:64
Ириса	128	1:2048
Душистого табака	170	1:64
Подорожниковый	64	1:64
Цифомандровый	55	1:128
Ядерный «О»	43	1:32
Белены	38	1:32
Фибриллярный	25	1:32
Петлевидный	16	1:32
Нарциссовый-412	8	1:128
ОМ	—	1:4
Перцевый	42	—

вый, петлевидный и др. (любезно предоставлены Т. Подъяпольской, Институт общей генетики, г. Москва) и японский штамм «ОМ» (Ю. Журавлевым, г. Владивосток).

Ко всем изучаемым изолятам и штаммам ВТМ были получены специфические антисыворотки. Наши исследования показали, что для получения активной антисыворотки достаточно 400–800 мкг вируса за весь цикл иммунизации при 3–4-кратном введении антигена с адьювантом любым способом. Динамика накопления антител в крови иммунизированного животного зависела от реактивности животного.

Индивидуальные отличия изолятов и штаммов ВТМ наблюдали уже при определении концентрации вируса в очищенных препаратах. Выход вируса на 1 кг зеленой массы табака был разным при всех равных условиях выращивания растений в теплице, сроках инокуляции и снятия листьев. Также для изучаемых изолятов и штаммов ВТМ отмечена различная иммуногенность капсидных белков при получении кроличьих специфических антисыворот и выявлены их отличия в антигенной активности при постановке иммунохимических реакций (табл. 48). Индивидуальные и вирусспецифические эпитопы капсидных белков выявляли РДД (рис. 111).

Результаты РДД были подтверждены более высокочувствительным методом РИЭФ (рис. 112), который позволил выявить более широкий спектр специфических антител у каждого изучаемого штамма и изолята вируса.



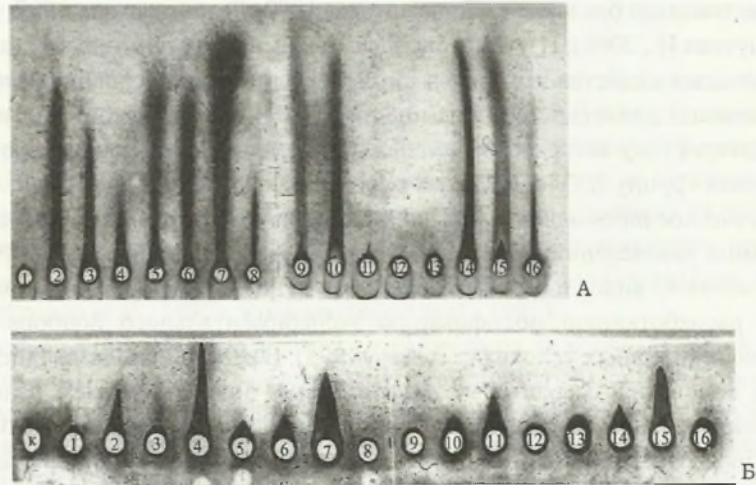
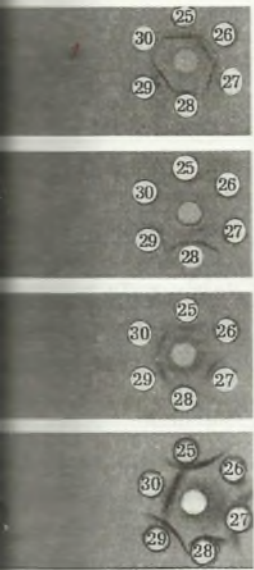
**Рис. 111.** Результаты РДТ по выявлению видо- и родоспецифических эпитопов у изучаемых изолятов ВТМ. В центральных лунках – Ас к изолятам ВТМ из зорьки (А), ириса (Б), нарцисса-216 (В), нарцисса-412 (Г). В периферических лунках – Аг. А: 1 – ВТМяд. «О», 3 – ВТМк, 6 – ВТМо, 7 – ВТМ-412, 9 – ВТМп, 11 – ВТМи, 13 – ВТМпетл., 15 – ВТМ-216, 17 – ВТМц, 19 – ВТМф, 21 – ВТМяд. «Т», 24 – контроль (сок здорового растения), 25 – ВТМпод, 27 – ВТМб, 29 – ВТМт. Б: 2 – ВТМ-412, 4 – ВТМ-216, 6 – ВТМпод., 8 – ВТМф., 10 – ВТМпетл., 12 – ВТМо, 14 – ВТМяд. «Т», 16 – ВТМт, 18 – ВТМц, 20 – ВТМк, 22 – ВТМз, 24 – ВТМп, 26 – контроль, 28 – ВТМб, 30 – ВТМяд. «О». В: 1 – ВТМт, 2 – ВТМ-412, 4, 6 – ВТМо, 8 – ВТМц, 10 – ВТМб, 12 – ВТМф, 14 – ВТМп, 16 – ВТМпод, 18 – ВТМи, 20 – ВТМяд. «Т», 22 – контроль, 24 – ВТМк, 26–28 – ВТМяд. «О», 30 – ВТМз. Г: 2 – ВТМо, 4 – ВТМц, 6 – ВТМф, 8 – ВТМпетл., 10 – ВТМп, 12 – ВТМпод., 14 – ВТМ-216, 16 – ВТМз, 18 – ВТМи, 20 – ВТМк, 22 – ВТМяд. «Т», 24 – ВТМ яд. «О», 26 – контроль, 28 – ВТМт, 30 – ВТМз

Наиболее антигенноактивными проявили себя дальневосточные декоративные изоляты: ВТМ-412, ВТМ-216, ВТМи. Они имели наибольший процент гомологии эпитопов капсидных белков со всеми изучаемыми изолятами ВТМ – 91 %, 80 %, 60 % соответственно. Процент родства между изолятами был рассчитан по степени антигенной специфичности эпитопов капсидных белков. Высоту ракет, сформировавшихся при взаимодействии антигена со специфическими антителами, принимали за 100 %, антигенное родство обозначали «А», а высоту ракет, образовавшихся в гетерологических системах, – «В». Степень антигенного родства «Х»-штаммов рассчитывали по формуле:  $X = A : B \times 100 \%$ .

По данным РИЭФ штаммы были разделены по антигенным свойствам на три серологические группы: I – антигенноактивная, II – специфическая (обособленная), III – группа с низкой антигенной активностью. В первую группу включили фибриллярный, цифомандровый, петуниевый, петлевидный штаммы ВТМ и дальневосточные изоляты из нарциссов, картофеля и душистого табака, у которых был выявлен весь набор видоспецифических антигенных детерминант (специфические антисыво-

Рис. 111  
лятов ВТМ.  
4 – ВТМ-216  
11 – ВТМи.  
ВТМ из зорьки  
6 – ВТМ-412  
13 – ВТМ-216  
ротки в штаммах  
ми штаммов ВТМ и дальневосточных  
более близкого родства с дальневосточными  
Италия  
ности штаммов ВТМ  
ских реакциях  
свои индивидуальные  
ным и антигенным





**Рис. 112.** Выявление идентичных эпитопов капсидных белков РИЭФ у дальневосточных изолятов ВТМ. А: система изолята ВТМ из зорьки, в лунках Аг: 1 – ВТМз, 2 – ВТМб, 3 – ВТМпетл., 4 – ВТМ-216, 5 – ВТМц, 6 – ВТМяд. «О», 7 – ВТМпод., 8 – ВТМф, 9 – ВТМ-412, 10 – ВТМом, 11 – ВТМт, 12 – ВТМк, 13 – ВТМб, 14 – ВТМяд. «Т», 15 – ВТМи, 16 – ВТМп. Б: система изолята ВТМ из петунии, в лунках Аг: к – контроль, 1 – ВТМп, 2 – ВТМом, 3 – ВТМц, 4 – ВТМз, 5 – ВТМф, 6 – ВТМ-412, 7 – ВТМяд. «Т», 8 – ВТМяд. «Т», 9 – ВТМк, 10 – ВТМпетл., 11 – ВТМпод., 12 – ВТМо, 13 – ВТМт, 14 – ВТМ216, 15 – ВТМб, 16 – ВТМи

эпитопов у изучаемых ириса (Б), нарцисса-216, 3 – ВТМк, 6 – ВТМо, ВТМд, 19 – ВТМф, 21 – ВТМб, 29 – ВТМт. Б: 2 – ВТМб, 14 – ВТМяд. «Т», 16 – ВТМб, 30 – ВТМяд. «О», 14 – ВТМп, 16 – ВТМпод. «О», 30 – ВТМз. Г: 2 – ВТМ-216, 16 – ВТМз, 28 – ВТМт, 30 – ВТМз

очные декоративные процент гомологии ВТМ – 91 %, 80 %, рассчитан по степени ракет, сформировав-телями, принимали за вызвавшихся в гетеро-штаммов рассчитывали

ым свойствам на три еская (обособленная), у включили фибрил-ВТМ и дальневосточ-которых был выявлен фицические антисыво-

ротки в перекрестных иммунохимических реакциях реагировали со всеми изучаемыми штаммами и изолятами ВТМ). Во вторую группу вошли подорожниковый штамм ВТМ и дальневосточные изоляты из белены, зорьки и ириса, которые показали наиболее близкое антигенное родство только между собой и слабовыраженное с другими изучаемыми штаммами и изолятами ВТМ. В третью группу отнесли штаммы ВТМ: казахский, обычный, ядерные «Т» и «О», японский «ОМ», которые отличались слабой иммуногенной и антигенной активностью. Полученные антисыворотки к этим штаммам имели низкий титр специфических антител, а в перекрестных реакциях отмечено слабовыраженное антигенное родство как между собой, так и с другими штаммами и дальневосточными изолятами ВТМ.

Итак, результаты сравнительного изучения антигенной и иммуногенной активности штаммов и изолятов ВТМ в гомологичных и гетерологичных иммунохимических реакциях (РДД, РИЭФ) показали, что они имели как вирусспецифичные, так и свои индивидуальные эпитопы капсидных белков и четко различались по иммуногенным и антигенным свойствам, что позволило разделить их на три группы.

### Приморские изоляты ВТМ из овощных культур

На рубеже прошлого века и в начале нового столетия впервые на юге Приморья были выявлены изоляты ВТМ на важных в экономическом плане овощных культу-

рах – перце, томате и баклажане (Толкач и др., 1992; Гнутова и др., 1997; Gnutova et al., 1998; Гнутова И., 2000). Изучены биологические, физико-химические, антигенные и цитопатогенные свойства этих изолятов ВТМ. Кроме того, сравнительный анализ вновь выявленных дальневосточных изолятов ВТМ, некротического штамма ВТМ из перца, характеристику которого мы привели выше, и описанных в литературе позволил определить группу ВТМ в пределах одного вида *Tobacco mosaic virus*.

**Биологическое тестирование.** Для выявления круга растений-хозяев и описания симптомов заболеваний, вызываемых изолятами из овощных культур, были испытаны растения 45 видов и сортов из 9 семейств. При изучении новых изолятов ВТМ применяли разработанную модификацию экспериментального подбора растений-индикаторов в тепличных условиях (Толкач, 1995). В работе использовались растения следующих семейств: Амарантовые *Amaranthaceae* Juss., Маревые *Chenopodiaceae* Vent., Тыквенные *Cucurbitaceae* Juss., Крестоцветные *Brassicaceae* Burnett., Бобовые *Fabaceae* Lindl., Пасленовые *Solanaceae* Juss., Норичниковые *Scrophulariaceae* Juss., Колокольчиковые *Lobeliaceae* Juss. и Коммелиновые *Commelinaceae* R. Br.

**Передача.** Для механической инокуляции использовалась суспензия из листьев растений, зараженных исследуемым вирусом, которые измельчались и растирались в ступке с 0,01 М раствором фосфатного буфера, рН 7,5. Полученную суспензию наносили на поверхность листьев тест-растений, напыленных карборундом, инфицирование проводили с помощью пестика. Затем фиксировали дату появления первых признаков вирусного поражения и описывали симптомы заболевания. При отсутствии симптомов на инокулированных растениях проверяли их на наличие латентной инфекции. С этой целью по истечении 30 дней после инфицирования испытуемого растения сок из верхних листьев использовали для инокуляции листьев *N. tabacum* cv. Xanthi, четко реагирующего на заражение ВТМ локальными некрозами.

### Изоляты ВТМ, поражающие перцы

Вирус довольно широко распространен на этой культуре во всем мире. В бывшем СССР перцы, пораженные ВТМ, были выявлены в Латвии (Дамрозе и др., 1972) и Узбекистане (Власов, 1992). В России на ДВ В.Ф. Толкач (1995) впервые идентифицировала на перце некротический штамм ВТМ (ВТМпн).

В Японии выявлены три штамма ВТМ на перцах, произрастающих в открытом грунте: обычный, томатный и желтый (Osaki, Arai, 1975). Латентный штамм ВТМ на перце бессимптомно заражал *N. tabacum* cv. Samsun и локально – *L. esculentum* (Greenleaf et al., 1964). Позднее подобные штаммы идентифицировали Feldman, Oremianer (1972). В Нигерии на растениях карликового перца идентифицировали штамм ВТМ, сходный с типичным, за исключением того, что он индуцировал локальные поражения с последующей системной некротизацией на *N. glutinosa*, *N. tabacum* и *D. stramonium*. Отмечено, что этот штамм вызывал опадение листьев и гибель мо-



лодых растений у физалиса флориданского *Ph. floridana* и дурмана метел *D. metel* L. (Igwegbe, 1983).

Во Франции на перце выделен штамм ВТМ, который не заражал *L. esculentum* и перец китайский *C. chinense* Jacquin (Gebre et al., 1981). В Югославии идентифицировали перцевый некротический штамм (Tosic, Videnov, 1981). В Болгарии выявлен оригинальный штамм, который при нормальной температуре не заражал *N. sylvestris*, *N. tabacum* cvs. Samsun, Samsun NE1, тогда как при температуре 30 °С вызывал на этих растениях симптомы (Строименова, 1984). Автор назвала этот штамм перцевым. Кроме того, ВТМ на перце идентифицировали в Голландии (Rast, Maat, 1986), Испании (Blanco et al., 1987), Японии (Nagai et al., 1981).

В последнее десятилетие в разных странах мира на посадках перца распространились новые штаммы ВТМ, вызывающие системную реакцию у сверхчувствительных сортов. В Болгарии из мозаичных растений сладкого перца сорта Чудо Бруипсма, пораженных ВТМ, были выделены изоляты, отличающиеся по своим биологическим свойствам от известных штаммов этого вируса. Все изоляты не заражали *N. tabacum* cv. Samsun и *N. sylvestris*, но при этом вызывали мозаику на листьях всех испытанных чувствительных и СВЧ-сортов перца. Изоляты из мозаичных растений перца сверхчувствительного сорта Данюб отнесены к томатным и табачным штаммам ВТМ (Иванова, Сухов, 1981).

В настоящее время фитовирусологами на перцах идентифицировано большое количество различных штаммов ВТМ. Ранее многие изоляты из перца ошибочно относили к штаммам ВТМ, но в результате более углубленных исследований патогены оказывались новыми вирусами рода *Tobamovirus* (Tobias et al., 1983; Pares, 1985; Wetter et al., 1987; цит. по: Tanzi et al., 1988). Так, в 1977 году Бетти с соавт. (Betti et al., 1977) изучили штамм ВТМ, выделенный ими из перца, произрастающего в теплице. Однако после исследования биологических и антигенных свойств патогена был сделан вывод, что этот штамм является вирусом мозаики перца рода *Tobamovirus* (цит. по: Tanzi et al., 1988).

Поражение посадок перца штаммами ВТМ приводит к большим потерям урожая. Так, в Венгрии поражение перцев достигало 25,4 % (Kiss et al., 1983). В Румынии перцы в большей степени (до 70–80 %) поражались ВТМ в закрытом грунте, в полевых условиях их поражаемость достигала 30–40 % (Stoenescu, 1984). В Азербайджане в зависимости от района и сорта поражаемость перцев составляла 7,6–27,3 % (цит. по: Власов, 1992).

Перцевый дальневосточный изолят ВТМ. Соком из растения перца с симптомами хлоротичной мозаики инокулировали листья *N. tabacum* cvs. Samsun и Xanthi. Реакция на заражение была характерна для ВТМ. Данный изолят являлся исходным материалом для дальнейшего выделения и изучения изолята этого вируса. Чистоту изолята обеспечивали 3-кратными пассажами через некрозы на *N. tabacum* cv. Xanthi и выделением вируса из отдельных некрозов.

Результаты электронной микроскопии показали, что в препаратах, приготовленных из листьев растений, инфицированных изучаемым изолятом, присутствовали частицы длиной 300 нм, характерные для ВТМ (рис. 113).



Рис. 113. Электронная микрофотография вирусных частиц ВТМ ( $\times 32000$ )

Для определения круга растений-хозяев патогена использовали растения 45 видов и сортов из 9 семейств. Изолят из перца (ВТМп) вызывал различные симптомы заболевания только у 25 инфицированных растений. Табаки, инокулируемые ВТМп, четко реагировали на заражение. У табаков *N. tabacum* cv. Samsun, *N. sylvestris* и *N. alata* патоген вызывал на 7–9-й день яркую системную мозаику, позднее развивалась легкая деформация листьев.

На листьях табаков сандера *N. sandera* Wats. и *N. tabacum* cv. Xanthi на 3–4-й день развивались локальные некрозы. У махорки *N. rustica* первоначальным признаком поражения также являлись локальные некрозы, на более поздних стадиях заболевания наблюдали хлоротичную мозаику и деформацию листовых пластинок. Растения никандры физалисовидной *Nicandra physaloides* (L.) Jaertn. реагировали на инфекцию четко выраженными некротическими кольцами с черным ободком (рис. 114).

Растения трех видов дурмана – обыкновенного *D. stramonium*, фeroxс *D. ferox* L. и метелевидного *D. meteloides* Dun. – реагировали на заражение многочисленны-

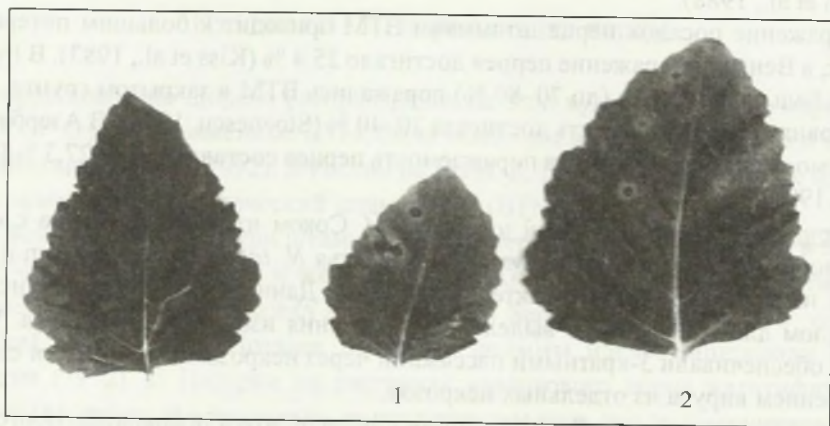


Рис. 114. Локальное поражение листьев нижнего (1) и среднего (2) ярусов *Nicandra physaloides*, инокулированных изолятом ВТМ из перца; слева – лист здорового растения



ми локальными некрозами. На листьях *L. esculentum* сортов Невский и Хабаровский изучаемый изолят вызывал сильную деформацию, системную хлоротичную мозаику и светло-зеленые вздутия, а на сорте Новичок – хлоротичную мозаику.

Локальными некрозами отвечала на инфицирование исследуемым изолятом ВТМп гоμφрена шаровидная *G. globosa*. Растения мари душистой *Ch. ambrosoides* и мари стеной *Ch. murale* формировали на листьях локальные некротические кольца. Некротическими пятнами реагировала на заражение *Ch. quinoa*, у мари амарантоцветной *Ch. amaranticolor* наблюдались локальные некротические пятна, у *C. annuum* – локальные некротические кольца, со временем инфекция вызывала системную хлоротичную мозаику. Перец ягодовидный *C. baccatum* L. реагировал на 10-й день после инокуляции на заражение системной мозаикой и деформацией листьев. Небольшие некротические пятна наблюдались у баклажана *Solanum melongena* L. (рис. 115), а растения *S. nigrum* реагировали на поражение хлоротичной мозаикой. Растения петунии гибридной *P. hybrida* реагировали на инокуляцию ВТМпн сначала локально, а затем системно, что проявлялось в хлорозе жилок. Томат мелкоплодный *L. pimpinellifolium* Mill. и львиный зев *Antirrhinum majus* L. внешне были здоровы, так как инфекция принимала латентную форму.

Вирус не заражал следующие растения разных видов и сортов: щирицу хвостатую *Amaranthus caudatus* L., амарант гибридный *Am. hybridus* L., гоμφрену декумбес *G. decumbens* L., бурачок скальный *Alyssum saxatile* L., иберис горький *Iberis amara* L., левкое *Matthiola incana* Br., горчицу белую *Sinapis alba* L., лобелию одутлую *Lobelia inflata* L., марь доброго Генриха *Ch. bonus henricus* L., марь головчатую *Ch. capitatum* L., тинантию прямостоячую *Tinantia erecta* Schlent., *Cucumis sativus* сортов

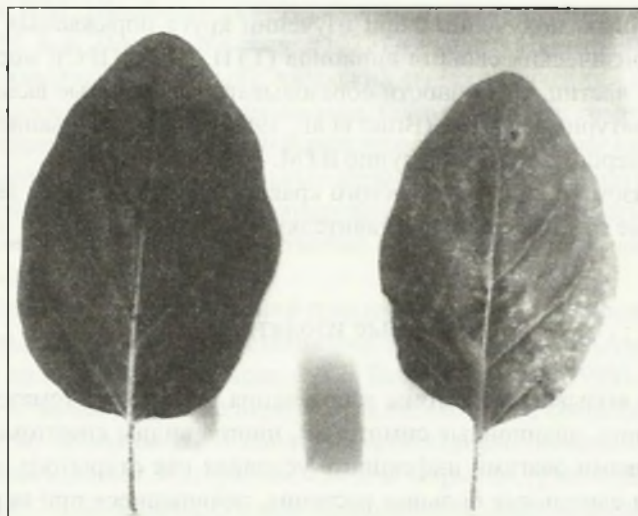


Рис. 115. Локальное поражение листа *Solanum melongena*, вызванное изолятом ВТМп; слева – здоровый лист баклажана.

Миг и ДВ-6, дыню *Cucurbita melo* L., кабачок *Cucurbita pepo* L., бобы конские *Faba bona* Medic., люцерну посевную *Medicago sativa* L., *Ph. vulgaris* cv. Perlicka, табак лонгифлора *N. longiflora* и паслен сладко-горький *S. dulcamara* L.

ВТМп был стабилен, в соке из листьев пораженного им *N. tabacum* cv. Samsun имел ТТИ 90 °С, ПСИ – более 2 мес и ПРС –  $10^{-12}$ . У табака *N. tabacum* cv. Samsun, инокулированного ВТМп, в эпидермисе жилок листа были обнаружены кристаллические включения в виде крупных правильных гексагональных пластинок и слоистых околядерные Х-тел, подобных тем, которые образуются при заражении табачным (типичным) штаммом ВТМ (рис. 116).

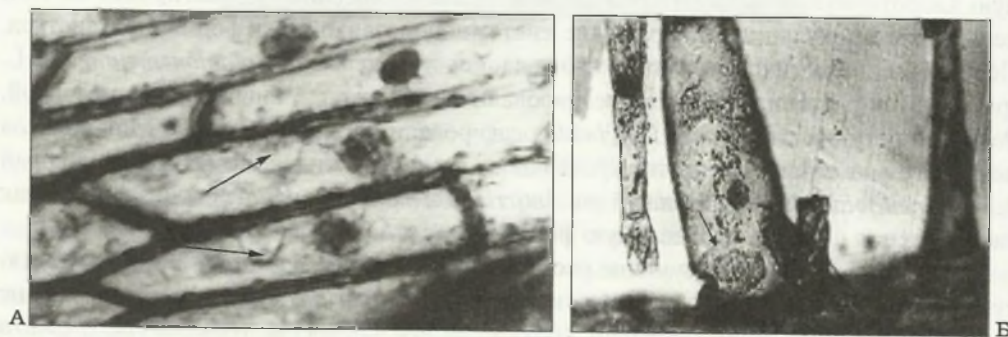


Рис. 116. Вирусные включения, индуцируемые изолятом ВТМ из перца, в клетках *N. tabacum* cv. Samsun: А – гексагональные пластинки в эпидермисе центральной жилки листа; Б – слоистое околядерное Х-тело в эпидермисе проводящей жилки (включения обозначены стрелками)

Анализ данных, полученных при изучении круга поражаемых растений, симптоматики, физических свойств вирионов (ТТИ, ПСИ, ПРС), морфологии и размеров вирусных частиц, способности образовывать характерные включения, а также известные литературные данные (Brunt et al., 1997 b) дают основание отнести вирус, выделенный из перца, к обычной группе ВТМ.

Таким образом, на юге Приморского края идентифицированы два изолята ВТМ из перца, которые относятся к представителям обычной (табачной) и некротической групп.

### Томатные изоляты ВТМ

Они могут вызывать симптомы заболевания на листьях томатов (мозаику, папоротниковидность, энационные симптомы), иногда видны симптомы поражения на плодах. Первичными очагами инфекции в условиях как открытого, так и закрытого грунта являются единичные больные растения, появившиеся при передаче ВТМ через семена. Было установлено, что резерваторами ВТМ из сорных растений являются паслен черный *Solanum nigrum* L. и повилика *Cuscuta campestris* Jucker., то есть те сорные растения, которые часто встречаются в посадках томатов.



Томатные штаммы ВТМ были идентифицированы и исследованы во многих странах. Ареал распространения таких штаммов чрезвычайно широк. В Египте изучали круг растений-хозяев 8 штаммов ВТМ. Все они вызывали на *P. hybrida* латентную инфекцию. По симптоматологии 3 штамма отнесли к томатным, один – к обычному штамму ВТМ, а другие четыре вызывали неспецифические симптомы на *N. sylvestris*, *N. rustica* и *N. tabacum* cv. White Barley и поэтому их не смогли с определенностью отнести к какой-либо группе штаммов ВТМ (Allam et al., 1978).

В Индии также изучали штамм ВТМ, выделенный из растений томатов, который поражал локально *N. sylvestris*. Вирус накапливали в *N. tabacum* cv. Samsun. Вирусные частицы при рассмотрении в электронном микроскопе имели вид жестких палочек. м.м. капсидного белка составляла 18 кДа. При секвенировании участка геномов табачного и исследуемого штамма ВТМ, включающего ген белка оболочки, была показана высокая степень гомологии нуклеотидных последовательностей (93,1%), обуславливающая лишь 9 изменений в аминокислотной последовательности структурного белка. На основании полученных результатов изучаемый штамм был отнесен к группе томатных штаммов ВТМ (Cherian et al., 1999).

В Эфиопии немецкие вирусологи (Hiskias et al., 1999) выявили томатный штамм ВТМ на растениях томатов, дурмана обыкновенного *Datura stramonium* и физалиса флориданского *Physalis floridana* Ryab. Были исследованы 222 образца растений – определяли круг растений-хозяев, морфологию вирионов и антигенные свойства. К. Смит (1960) обнаружил на томатах 6 изолятов ВТМ, из которых три были известными вирусами: внутреннего побурения плодов *Tomato internalbrowning virus*, аukuба мозаика табака *Tobacco aucuba mosaic virus* и полосчатости томатов *Nicotiana virus 1C Smith*, или *Tomato streak virus*.

В Украине Б.М. Щербинин (1975) выявлял на томатах желтую форму аukuбы, вызванную ВТМ. А.Е. Проценко с соавт. (1977) изучали 5 томатных штаммов ВТМ – ленинградские (зеленый и желтый), казахский и два канадских (из Лемингтона и Онтарио) – и показали, что эти штаммы вызывают различные симптомы на одних и тех же тест-растениях. Так, *N. sylvestris* реагировал на заражение канадскими штаммами локальными некрозами, остальные штаммы вызывали системную реакцию. Разными симптомами отвечали на инфицирование *P. hybrida*, *Ph. floridana*, *Gomphrena globosa*, *L. esculentum* и *N. tabacum* cv. Samsun. Огурец посевной *Cucumis sativus* L. не поражался этими штаммами.

О разнообразных типах поражений томатов ВТМ в нашей стране свидетельствуют и результаты, полученные отечественными исследователями (Авдеев, Щербинин, 1975; Власов и др., 1978; Поликсенова, 1997; Толкач, Гнутова, 1998).

Томатные штаммы вируса не переносятся насекомыми, сохраняются в почве.

Большинство штаммов ВТМ наносят значительный экономический ущерб томатам, выращиваемым как в открытом, так и в закрытом грунте (Виллемсон, 1994; Поликсенова, 1997). Во многих странах производится учет заболевания посадок томатов, вызываемого штаммами ВТМ. Например, в 15 провинциях Северного Китая в период с 1990 по 1994 г. проводилось массовое обследование томатов на присутствие вирусов ВТМ, ВОМ, ХВК и УВК. В 3761 образцах растений томатов, пораженных

ВТМ, в основном присутствовали 3 штамма (Feng et al., 1996). В Болгарии в период с 1986 по 1994 г. при проверке томатов на вирусную инфекцию ВТМ занял второе место среди фитовирусов по поражаемости этой культуры (Христова, Кайтазова, 1996).

Дальневосточный томатный изолят ВТМ. Инокулом из листьев томата с яркой хлоротичной мозаикой и деформацией листьев вызывал на *N. tabacum* cvs. Samsun и Xanthi симптомы, характерные для вида ВТМ рода *Tobamovirus*. Этот образец и послужил исходным материалом для дальнейшего выделения и изучения этого изолята вируса. Чистоту изолята обеспечивали 3-кратными пассажами через некрозы на *N. tabacum* cv. Xanthi. Результаты электронно-микроскопического исследования препаратов из листьев растений, инфицированных изучаемым изолятом, показали наличие в них частиц, характерных для ВТМ.

Соком из системнопораженных листьев *N. tabacum* cv. Samsun заражали растения 45 видов и сортов из 9 семейств. Только у 23 видов инфицированных растений проявлялись четкие симптомы вирусного поражения.

Системная реакция в виде хлоротичной мозаики, светло-зеленых вздутий и сильной деформации верхних листьев наблюдалась на 7–9-й день у растений томатов *L. esculentum* сортов Новичок, Невский и Хабаровский. У растений *N. alata*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *D. ferox*, *D. meteloides* и *D. stramonium* на 3–6-й день после заражения на листьях появлялись локальные некрозы, в то время как *Nicandra physaloides* реагировала единичными некротическими мелкими кольцами. На 7-й день после инфицирования *N. tabacum* cv. Samsun на листьях наблюдали системную мозаику. Растения перцев *C. baccatum* отвечали на инокуляцию изолятом системной мозаикой и деформацией листьев, а *C. annuum* – сначала локальными некрозами, а затем на 8–10-й день – системным поражением в виде хлоротичной крапчатости.

Растения *P. hybrida* (рис. 117 а) на 3–5-й день после заражения томатным изолятом ВТМ (ВТМт) реагировали локальными некрозами. На 30-й день после инфицирования верхние листья этих растений проверяли на наличие латентной инфекции, инокулируя *N. tabacum* cv. Xanthi. Результат был отрицательный.

Растения *N. sandera* вначале реагировали на заражение некрозами, затем инфекция переходила в латентную форму (рис. 117 б). *N. sylvestris*, *S. nigrum* и *L. pimpinellifolium* поражались изучаемым изолятом бессимптомно. Локальными некротическими поражениями реагировали на заражение растения мари – *Ch. amaranticolor*, *Ch. ambrosioides*, *Ch. quinoa* и *Ch. murale*, а также *G. globosa*.

Не удалось заразить исследуемым изолятом следующие растения: *Am. caudatus*, *Am. hybridus*, *G. decumbens*, *Al. saxatile*, *Ib. amara*, *M. incana*, *Sinapis alba*, *Lobelia inflata*, *Ch. bonus henricus*, *Ch. capitatum*, *T. erecta*, *Cucumis sativus* сортов ДВ-6 и Миг, *Cucurbita melo*, *Cucurbita pepo*, *F. bona*, *Ph. vulgaris* cv. Perlička, *An. majus*, *N. longiflora*, *S. dulcamara* и *S. melongena*. Все эти растения были проверены на присутствие вируса в латентной форме. Вирус не был выявлен в соке этих растений капельной агглютинацией с помощью специфической антисыворотки.

Внутриклеточные включения у пораженных вирусом растений выявляли с помощью светового микроскопа (МБР-6) при увеличении в 200 раз. Окраску эпидермиса листьев проводили 0,5 %-ным трипановым синим по методике М. Гольдина (1963).



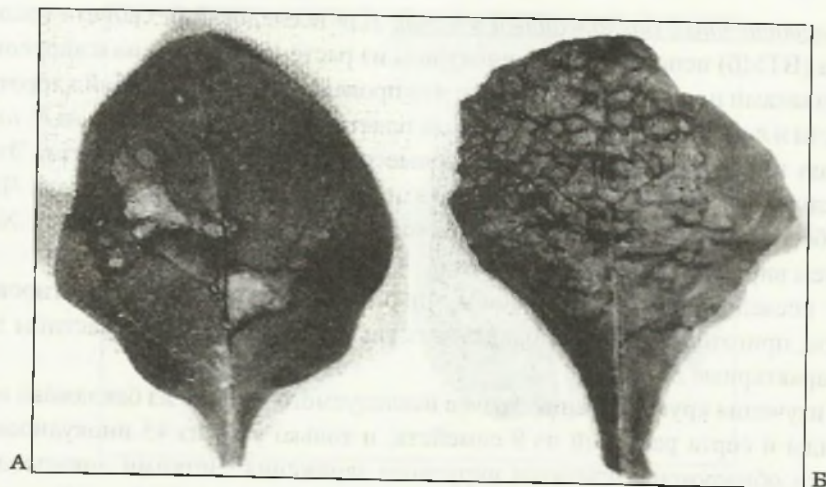


Рис. 117. Локальное поражение листьев *Petunia hybrida* (А) и *Nicotiana glauca* (Б), инфицированных изолятом ВТМ из томата

В клетках листьев табака *N. tabacum* cv. Samsun, инокулированного вирусом из томата, обнаружены околядерные Х-тела бобовидной формы в эпидермисе центральной жилки листа, а также крупные аморфные включения в основании первого членика эпидермального волоска.

ТТИ исследуемого изолята составила 90 °С, ПСИ – более 2 мес, ПРС –  $10^{11}$ .

На основании изученных биологических свойств ВТМт, вирусных включений, морфологии и размера вирионов мы пришли к заключению, что исследуемый патоген является вирусом табачной мозаики рода *Tobamovirus*. По реакции тест-растений *P. hybrida*, *N. rustica*, *N. alata* и *N. sylvestris*, другим биологическим свойствам и на основании имеющихся литературных данных (Гольдин, 1948; Власов и др., 1973; Игнаш, 1978) изучаемый изолят ВТМт отнесен к томатной группе.

#### Изоляты ВТМ из баклажана

Литературные данные о поражении ВТМ баклажанов немногочисленны. В Румынии в тепличных условиях у растений баклажанов сорта Мамут были обнаружены коричневые некротические полосы и пятна на стеблях, черешках и жилках. Заболевание проявлялось в подавлении роста всего растения, курчавости, искривлении и деформации листьев. Впоследствии молодые растения часто погибали. Растения-индикаторы *N. glutinosa* и *N. tabacum* cv. Xanthi на заражение вирусом отвечали некротическими пятнами. Электронно-микроскопические исследования показали в препаратах наличие частиц ВТМ. По биологическим свойствам этот изолят отнесли к томатной группе ВТМ (Pop, Jilaveanu, 1975).

Дальневосточный баклажанный изолят. Для исследований свойств изолята из баклажана (ВТМб) использовались инокулом из растения баклажана с вирусоподобными признаками поражения на листьях, что проявлялось в виде слабой хлоротичной пятнистости и легкой деформации листовых пластинок. Изолят вызывал на *N. tabacum* cvs. Samsun и Xanthi симптомы, характерные для ВТМ рода *Tobamovirus*. Этот образец послужил исходным материалом для изучения и выделения вируса. Чистоту изолята обеспечивали 3-кратными пассажами через некроз на *N. tabacum* cv. Xanthi и выделением вируса из отдельных некрозов.

При исследовании в электронном микроскопе негативно контрастированных препаратов, приготовленных из пораженных растений, наблюдались частицы длиной 300 нм, характерные для ВТМ.

Для изучения круга растений-хозяев исследуемого изолята из баклажана использовали виды и сорта растений из 9 семейств, и только у 24 из 45 инокулированных видов были обнаружены признаки вирусного заражения. Четкими локальными некрозами реагировали на 3–4-й день после заражения растения *D. ferox*, *D. meteloides*, *D. stramonium* (рис. 118), *Nicandra physaloides*, *N. alata*, *N. sandera*, *N. tabacum* cv. Xanthi (рис. 119) и *P. hybrida*. У *S. melongena* изолят вызывал локальные хлоротичные пятна. Растения *N. rustica* вначале отвечали на вирусное заражение локальной реакцией, затем инфекция становилась системной, но протекала бессимптомно.

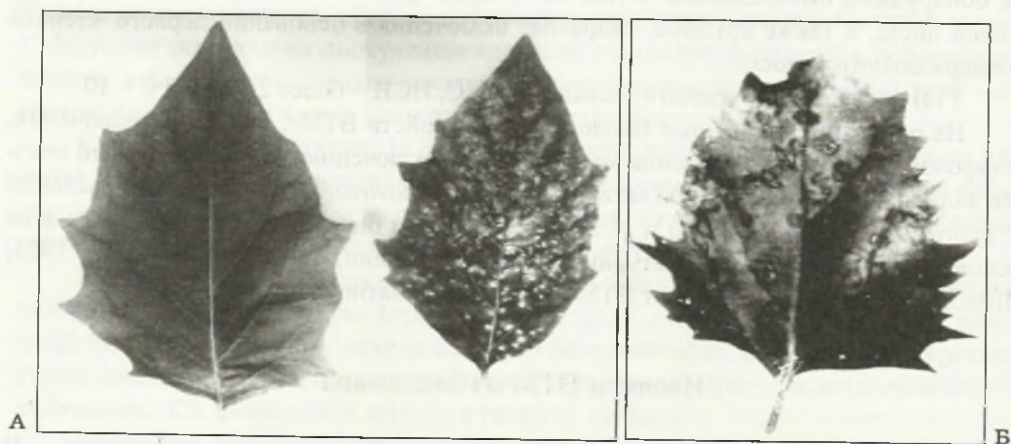


Рис. 118. Локальное поражение листьев *Datura stramonium* (А) и *Chenopodium murale* (Б), инокулированных изолятом ВТМ из баклажана; слева – лист здорового растения

Иследуемым изолятом вируса не поражались следующие растения: *Am. caudatus*, *Am. hybridus*, *G. decumbens*, *Al. saxatile*, *Ib. amara*, *M. incana*, *Sinapis alba*, *Lobelia inflata*, *Ch. bonus henricus*, *Ch. capitatum*, *T. erecta*, *Cucumis sativus* сортов ДВ-6 и Миг, *Cucurbita melo*, *Cucurbita pepo*, *F. bona*, *Ph. vulgaris* cv. Perlička, *An. majus*, *N. longiflora* и *S. dulcamara*. Проверка растений на наличие вируса в латентной форме не дала ни-

Рис. 119  
го изолятом В

каких резул  
цией с пом  
все исполь  
и *N. longifl*  
В клет  
на, в эпиде  
ческой форм  
ми и иглов

Рис. 120  
cv. Samsun, и



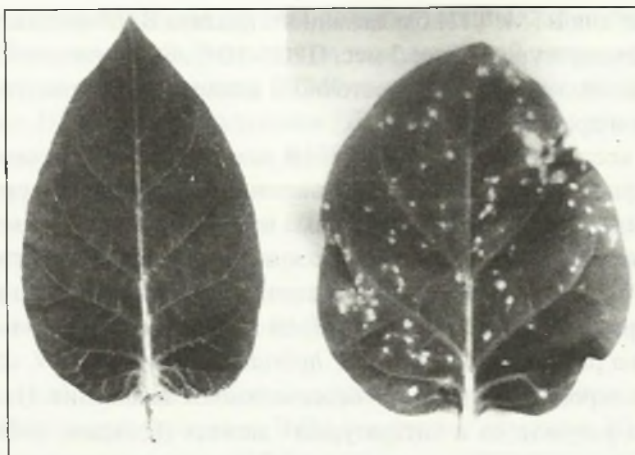


Рис. 119. Локальное поражение (некрозы) листа *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi, инфицированного изолятом ВТМ из баклажана; слева – лист здорового табака

каких результатов. Вирус не был выявлен в соке этих растений капельной агглютинацией с помощью специфической антисыворотки против ВТМ. Изолят инфицировал все используемые в эксперименте растения семейства *Solanaceae*, кроме *S. dulcamara* и *N. longiflora*.

В клетках табака *N. tabacum* cv. Samsun, инокулированного вирусом из баклажана, в эпидермисе листа выявлены кристаллические включения правильной октаэдрической формы с четко выраженными ровными, сходящимися в общей вершине гранями и игловидные включения (рис. 120). Кроме того, наблюдались рыхлые зернистые

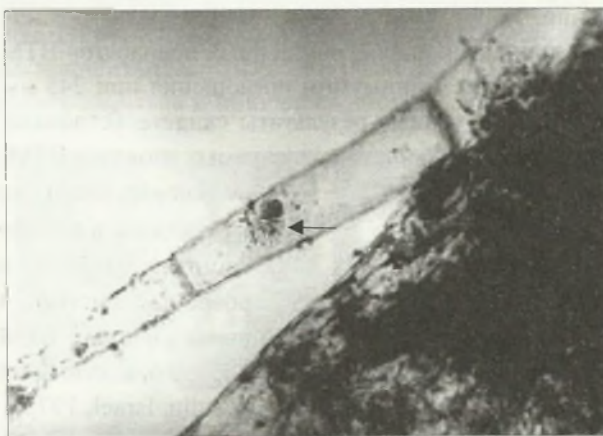


Рис. 120. Игловидное включение в эпидермальном волоске во 2-м членике табака *N. tabacum* cv. Samsun, индуцируемое изолятом ВТМ из баклажана (включение обозначено стрелкой)

X-тела, типичные для ВТМ. ТТИ баклажанного изолята ВТМ составляла 85 °С, ПСИ при комнатной температуре – более 2 мес, ПРС –  $10^{-12}$ . Более низкая ТТИ (80 °С), чем у ВТМб, описана только для дальневосточного штамма ВТМ, идентифицированного на ирисе (Толкач и др., 1988).

Результаты исследования круга растений-хозяев, физических свойств, морфологии и размера вирионов, внутриклеточных включений свидетельствуют о принадлежности ВТМб к виду рода *Tobamovirus*. Данные по изучению биологических и физических свойств показали, что ВТМб отличается от обычного (табачного) штамма ВТМ (Brunt et al., 1997 b), а также от дальневосточных (некротического и обычного) из перца. В то же время отмечено сходство ВТМб с ВТМт по симптоматологии на тест-растениях. Они на растениях *N. rustica*, *P. hybrida*, *N. sylvestris* и *N. alata* продуцировали локальные некрозы или вызывали бессимптомное заражение. На основании анализа полученных результатов и литературных данных (Гольдин, 1948; Власов и др., 1973; Игнаш, 1978) мы считаем, что ВТМб следует отнести к томатной группе ВТМ.

В России ВТМ из баклажана идентифицирован нами впервые.

Дальнейшая идентификация дальневосточных изолятов ВТМ, поражающих овощные культуры, заключалась в изучении их физико-химических и антигенных свойств.

**Физико-химическая и антигенная характеристики. Получение очищенных препаратов.** Изоляты ВТМ размножали и накапливали в растениях *N. tabacum* cv. Samsun. Для получения препаратов очищенных вирусных частиц ВТМп, ВТМт и ВТМб использовали листья среднего яруса с хлоротичными пятнами на 15-й день после инокуляции. ВТМпн накапливали в растениях *S. annuum* и (или) *S. bacatum*. Растения-накопители инокулировали соком больных листьев, разведенным 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,5. Листья зараженных растений срывали на 20–24-й день после заражения. Очистку вируса проводили по методике В. Новикова с соавт. (1984) в нашей модификации.

Спектрофотометрический анализ очищенных препаратов ВТМ показал наличие нуклеопротеидного спектра с минимумом поглощения при 245 нм и максимумом – при 265 нм (табл. 49). Полученные результаты свидетельствовали об относительно высокой концентрации и стабильности исследуемых изолятов ВТМ в соке *N. tabacum*

Таблица 49

Характеристика препаратов изучаемых изолятов ВТМ

Изоляты	$A_{260/280}$	Содержание вируса (мг) в 100 г листовой массы
ВТМп	1,18	84,50
ВТМт	1,21	79,20
ВТМб	1,17	73,30
ВТМпн	1,25	72,18

cv. Samsun. Выход вируса, как следует из таблицы, в зависимости от изолята, составил 70–85 мг на 100 г инфицированных листьев. Очищенные препараты изолята ВТМ имели величину  $A_{260/280}$ , близкую к оптимальной, – 1,2 (Zaitlin, Israel, 1975).

**Антигенные свойства.** Получение специфических антисывороток. Антигены-штаммы ВТМб (томатная



группа) и ВТМпн (некротическая группа), которые вводили животным по удлинённой схеме иммунизации, оказались разными по иммуногенной активности. По результатам РДД и ИФА (непрямой вариант), ВТМб вел себя как более активный иммуноген по сравнению с ВТМпн. По результатам РДД были получены специфические антисыворотки к изолятам ВТМб с титром 1:128 и ВТМпн – 1:8.

Для определения титра антисывороток к изолятам ВТМ в непрямом варианте ИФА использовали антигены ВТМб и ВТМпн с концентрацией 10 мкг/мл и разведение антивидового конъюгата 1:400. По расположению кривых титрования определяли максимальное разведение антисывороток, составившее для ВТМб – 1:25600, а для ВТМпн – 1:3200. Полученные нами антисыворотки обладали строгой специфичностью.

*Антигенное родство дальневосточных изолятов ВТМ.* Степень антигенного родства между исследуемыми изолятами ВТМ выявляли с помощью РДД, РИЭФ, прямого варианта и сэндвич-варианта ИФА.

При постановке РДД использовали 1 %-ный Бакто-агар (Serva, ФРГ) в 0,15 М растворе хлористого натрия с добавлением 1,5 % ПЭГ (м.м. 6000) для более четкого проявления полос преципитации (Гнутова, 1985). В расплавленный на водяной бане агар добавляли антисептик – 0,01 %-ный азид натрия. После окончания формирования иммунного комплекса Аг–Ат агаровые пластинки тщательно многократно промывали физиологическим раствором (0,85 % NaCl), чтобы удалить непрореагировавшие антисыворотку (Ac) и антиген (Ag).

Для контроля ставили параллельно реакции с УВК и препаратом ВТМ (ВТМк) – вирусами, постоянно поддерживаемыми в коллекции лаборатории.

Сравнительный анализ антигенных взаимоотношений изолятов ВТМ, проведенный с помощью РДД, показал, что ВТМб и ВТМт давали реакцию идентичности, образуя схожие непересекающиеся полосы преципитации. Это свидетельствует о наличии идентичных эпитопов на поверхности капсидных белков обоих изолятов. ВТМпн с изолятами ВТМт и ВТМп формировал «шпору», если его полосу преципитации мысленно продлить (рис. 121). Эта реакция указывала на частичную идентичность исследуемых изолятов и принадлежность их к различным группам. Изолят

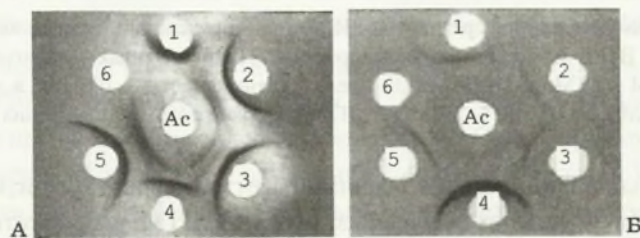


Рис. 121. Выявление идентичных эпитопов овощных изолятов ВТМ с помощью РДД. А: в центре Ac – к ВТМб, в лунках – антигены: 1 – ВТМк, 2 – ВТМт, 3 – ВТМб, 4 – ВТМб, 5 – ВТМт, 6 – контроль; Б: в центре – Ac к ВТМпн, в лунках – антигены: 1 – ВТМпн; 2 – ВТМп, 3 – ВТМк, 4 – ВТМпн, 5 – ВТМп, 6 – контроль

ВТМпн образовывал четкую полосу преципитации только со своей антисывороткой (рис. 121). ВТМп с антисыворотками к ВТМб и ВТМпн формировал такие же полосы преципитации, как и изоляты ВТМб и ВТМт.

Не удалось заразить исследуемым изолятом следующие растения: *Am. caudatus*, *Am. bonus henricus*, *Ch. capitatum*, *T. erecta*, *Cucumis sativus* сортов ДВ-6 и Миг, *Cucurbita melo*, *Cucurbita pepo*, *F. bona*, *Ph. vulgaris* cv. Perlička, *An. majus*, *N. longiflora*, *S. dulcamara* и *S. melongena*. Все эти растения были проверены на присутствие вируса в латентной форме. Вирус не был выявлен в соке этих растений капельной агглютинацией с помощью специфической антисыворотки против ВТМ.

Внутриклеточные включения у пораженных вирусами растений *G. decumbens*, *Al. saxatile*, *Ib. amara*, *M. incana*, *Sinapis alba*, *Lobelia inflata* выявляли с помощью светового микроскопа (МБР-6) при увеличении в 200 раз. Окраску эпидермиса листьев проводили 0,5 %-ным трипановым синим по методике М. Гольдина (1963). В клетках листьев табака *N. tabacum* cv. Samsun, инокулированного вирусом из томата, обнаружены окооядерные X-тела бобовидной формы в эпидермисе центральной жилки листа, а также крупные аморфные включения в основании первого членика эпидермального волоска.

Более четкие данные по антигенному родству исследуемых изолятов ВТМ были получены нами с помощью РИЭФ, который в сравнении с РДД имел более высокую чувствительность (рис. 122). Разведение антисывороток для ВТМб и ВТМпн, подобранное экспериментально, было для ВТМб 1:100–1:200, а для ВТМпн – 1:50–1:100. Продолжительность постановки РИЭФ составляла 2–2,5 ч при 30 мА и 120 В.

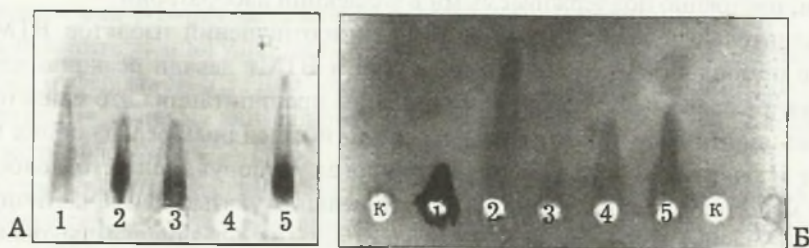


Рис. 122. Иммуноэлектрофореграммы РИЭФ при определении степени антигенного родства между штаммами ВТМ. А: в геле – антисыворотка к ВТМб, в лунках – антигены: 1 – ВТМк, 2 – ВТМт, 3 – ВТМб, 4 – ВТМпн, 5 – ВТМп; Б: в геле – антисыворотка к ВТМпн, в лунках – антигены: 1 – ВТМпн, 2 – ВТМп, 3 – ВТМк, 4 – ВТМб, 5 – ВТМт, к – контроль; концентрация антигенов 1 мг/мл

Сравнительное соотношение величин ракет позволило оценить наличие идентичных эпитопов у четырех изучаемых изолятов ВТМ в процентном отношении (табл. 50).

Как видно из таблицы, в системе Ас–ВТМб процент родства у штамма ВТМт к ВТМб был наивысший и составил 83,3 %, у ВТМп – 58,8 % и у ВТМпн – 0 %. В системе Ас–ВТМпн степень антигенного родства у изолятов ВТМб и ВТМт была 50 % и

45,4 % состав  
среднюю ста  
Наименьше  
фиксирован

Опреде  
капсидных  
ВТМ метал  
зультаты РД  
цента идент  
ВТМб, что  
антигенной  
ВТМпн (III

При по  
сорбционны  
генов (0,1 М  
ки несвязан  
твин-20)). Р  
0,15 М NaCl  
Субстраты  
0,05 %-ный  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ферм  
ли оптичес  
(Россия). В  
ты фирмы «

Перед  
(Clark, Adv  
разведение  
лунки плазм  
инкубацион  
вносили по  
родства шт  
до 1:102400  
Затем нано  
меченных п  
промывали  
и наблюдали  
качестве из  
ляли на изм

Поста



Определение антигенного родства (%) между изолятами ВТМ методом РИЭФ

Антисыворотки	Изоляты			
	ВТМп	ВТМт	ВТМб	ВТМпн
ВТМб	58,8	83,3	100	0
ВТМпн	26,3	45,4	50	100

45,4 % соответственно, что указывало на среднюю степень их родства с ВТМпн. Наименьшее родство (26,3 %) было зафиксировано у изолята ВТМп с ВТМпн.

Определение антигенного родства капсидных белков овощных изолятов ВТМ методом РИЭФ подтвердило результаты РДД о наличии высокого процента идентичных эпитопов у ВТМт и ВТМб, что позволяет отнести их к I серологической группе; среднее положение по антигенному родству среди штаммов занимает ВТМп (II серогруппа) и отдаленное – ВТМпн (III серогруппа).

При постановке ИФА были использованы следующие буферные растворы: абсорбционный буферный раствор (посадочный), pH 9,6, для сорбции антител и антигенов (0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,15 М NaCl) и промывочный буфер (PBS), pH 7,4, для отмывки несвязавшихся реагентов (0,01 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 М NaCl, 0,05 % твин-20 (ЗФР-твин-20)). Раствор для разведения антигенов и конъюгата, pH 7,5: 0,01 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 М NaCl, 0,1 %-ный бычий сывороточный альбумин («Serva», FRG)(ЗФР-БСА). Субстратный буфер, pH 5, для определения пероксидазной активности: использовали 0,05 %-ный ортофенилендиамин в 0,05 М цитратно-фосфатном буфере с 0,003 %-ной H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ферментативную реакцию останавливали через 10 мин 4Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность при длине волны 492 нм на спектрофотометре ИФКО-2 (Россия). В качестве твердофазного носителя использовали полистироловые планшеты фирмы «Медполимер» (Россия).

Перед постановкой непрямого варианта (Koenig, 1978) и сэндвич-варианта ИФА (Clark, Adams, 1977) предварительно подбирали концентрации иммуноглобулинов, разведение антисывороток, конъюгатов. Для постановки непрямого варианта ИФА в лунки планшета вносили по 20 мкг/мл антигена в 100 мкл буфера для сорбции. После инкубации при 4 °С, проводимой в течение 12 ч, планшеты отмывали. Затем в них вносили по 100 мкл антисыворотки в разведениях от 1:50 до 1:6400 для изучения родства штаммоспецифичных эпитопов, а для определения титра антисывороток – до 1:102400 в ЗФР-БСА. Инкубировали при 37 °С в течение 1 ч и затем промывали. Затем наносили по 100 мкл антивидового конъюгата (IgG осла против кроличьих IgG, меченных пероксидазой) в рабочем разведении 1:400, инкубировали 1,5 ч при 37 °С и промывали лунки планшета. На заключительной стадии наносили субстрат по 100 мкл и наблюдали цветную реакцию. Останавливали ферментную реакцию 4Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. В качестве контрольного антигена использовали УВК. Интенсивность окраски определяли на цифровом спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Постановка сэндвич-варианта ИФА заключалась в следующем:

– в лунку планшета вносили по 100 мкл раствора IgG в буфере для сорбции (посадочный буфер); инкубировали в течение 12 ч при 4 °С, затем трижды промывали 3ФР-твин-20;

– наносили по 100 мкл раствора исследуемых вирусных антигенов в 3ФР-БСА; инкубировали 1 ч при 37 °С, несвязавшиеся реагенты отмывали, как указано в пункте 1;

– добавляли по 100 мкл 3ФР-БСА и инкубировали 30 мин при 37 °С; промывали (см. пункт 1);

– вносили в лунки по 100 мкл конъюгата в разведении 1:500; содержимое лунок инкубировали 1,5 ч при 37 °С, затем промывали;

– добавляли по 100 мкл субстрата, смесь инкубировали 30–40 мин при 37 °С; останавливали ферментную реакцию 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Интенсивность окраски определялась на цифровом спектрофотометре при длине волны 492 нм. Постановка реакции проводилась в трехкратной повторности. В качестве контроля использовали гетерогенный вирус – YVK.

Цифровые данные оформлялись в виде калибровочных кривых. По расположению кривых титрования определяли антигенное родство исследуемых вирусов.

Непрямым и сэндвич-вариантами ИФА определялись в гомо- и гетеросистемах как антигенная специфичность изучаемых изолятов ВТМ, так и вирусспецифичные и индивидуальные для изолятов ВТМ эпитопы. Характер кривых титрования свидетельствовал об антигенном родстве между всеми изучаемыми дальневосточными изолятами ВТМ.

Для определения антигенных взаимоотношений непрямым вариантом ИФА использовали антигены ВТМп, ВТМт, ВТМб и ВТМпн с концентрацией 20 мкг/мл и антивидовой конъюгат в разведении 1:400.

При постановке сэндвич-варианта ИФА были использованы иммуноглобулины, полученные только к ВТМпн. Из 2,5 мл антисыворотки выделили 11,6 мг IgG. Рабочее разведение иммунопероксидазного конъюгата составило 1:500 (2–5 мкг/мл).

Суммируя данные по степени антигенного родства между дальневосточными изолятами ВТМ, полученные нами с помощью иммунохимических методов, можно заключить, что изоляты имеют как вирусспецифические, так и индивидуальные эпитопы.

Итак, идентифицированы классическими методами дальневосточные изоляты ВТМ на овощных культурах – перце, томате и баклажане. Показано, что все исследуемые изоляты различались по кристаллическим и аморфным включениям (Х-телам), образуемым в зараженных клетках табака. Выявленные включения могут служить диагностическим признаком этих изолятов ВТМ. Определен круг растений-хозяев (45 видов и сортов из 9 семейств) и выявлены различия изолятов по симптоматологии. Установлено, что дальневосточный изолят ВТМб имеет наиболее низкую точку термической инактивации (85 °С) в сравнении с двумя другими изученными изолятами и штаммами ВТМ. Иммунохимическими методами (РДД, РИЭФ, непрямым вариан-

том и сэндвич-вариантами ИФА определялись в гомо- и гетеросистемах как антигенная специфичность изучаемых изолятов ВТМ, так и вирусспецифичные и индивидуальные для изолятов ВТМ эпитопы. Характер кривых титрования свидетельствовал об антигенном родстве между всеми изучаемыми дальневосточными изолятами ВТМ.

При постановке сэндвич-варианта ИФА были использованы иммуноглобулины, полученные только к ВТМпн. Из 2,5 мл антисыворотки выделили 11,6 мг IgG. Рабочее разведение иммунопероксидазного конъюгата составило 1:500 (2–5 мкг/мл). Суммируя данные по степени антигенного родства между дальневосточными изолятами ВТМ, полученные нами с помощью иммунохимических методов, можно заключить, что изоляты имеют как вирусспецифические, так и индивидуальные эпитопы.

Рис. 1. Кольцевая и календарная диаграммы.

Вместо ВТМб разность не титральных и титральных изолятов N. glauca слабой об-



том и сэндвич-методом ИФА) показана степень антигенного родства изолятов ВТМц, ВТМт, ВТМб и ВТМпн. Выявлены вирусспецифические и индивидуальные эпитопы капсидных белков изолятов. Показано, что изолят ВТМб является активным иммуногеном. К изоляту получена антисыворотка, которую можно использовать для детекции других изолятов ВТМ. На основании данных, полученных при изучении биологических, физических, физико-химических и антигенных свойств, изоляты ВТМт и ВТМб отнесены к томатной, ВТМп к табачной, а ранее изученный изолят ВТМпн – к некротической группам ВТМ.

**Приамурские овощные изоляты ВТМ.** На ДВ России помимо 12 изолятов ВТМ, выявленных на территории Приморского края, были исследованы свойства 2-х изолятов ВТМ, впервые обнаруженных на растениях томатов (ВТМт/х) и баклажанов (ВТМб/х) в районе нижнего Приамурья в Хабаровском крае.

Исследование показало, что ВТМт/х и ВТМб/х имеют сходные биологические свойства. Одинаковые реакции на заражение были отмечены у растений *Ch. amaranticolor*, *Ch. ambrosioides*, *Ch. quinoa*, *Ch. murale*, *D. stramonium* и *D. ferox*, *H. niger*, *N. tabacum* cv. Xanthi, *L. esculentum* и *P. hybrida* (рис. 123). Симптомы были типичны для ВТМ согласно литературным данным (табл. 51).

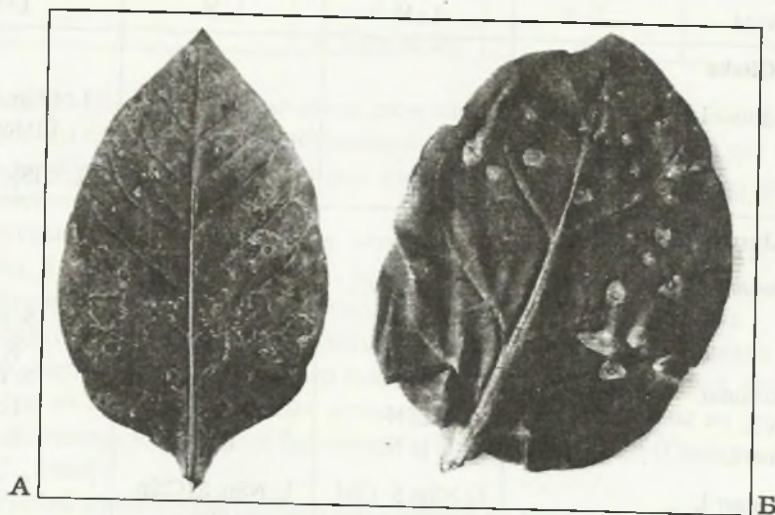


Рис. 123. Симптомы вирусного поражения приамурскими изолятами ВТМ: А – симптомы кольцевой мозаики на листе *N. tabacum* cv. Samsun, пораженного изолятом ВТМ из томата; Б – локальные некрозы на листе *N. tabacum* cv. Xanthi после инокуляции изолятом ВТМ из баклажана

Вместе с тем ответные реакции некоторых тест-растений на инокуляцию ВТМт и ВТМб различались. Так, у растений *N. physaloides* при заражении ВТМт/х наблюдалась не только местная, но и системная реакция в отличие от ВТМб/х. На листьях растений *N. tabacum* cv. Samsun развивалась яркая кольцевая мозаика, отличная от очень слабой обычной мозаики, характерной для ВТМб/х.

Реакция тест-растений  
на заражение приамурскими изолятами ВТМ

Растения семейства, вида, сорта	ВТМ7/x	ВТМ6/x	ВТМк
<b>Aizoaceae J.G. Agardh</b>			
<i>Tetragonia expansa</i> L.	L: N	—	L: NR
<b>Amaranthaceae Juss.</b>			
<i>Gomphrena decumbens</i> L. <i>G. globosa</i> L.	L: ClSp L: N; S: O	— L: NSp; S: M	L: ClSp L: N
<b>Chenopodiaceae Vent.</b>			
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn. <i>Ch. ambrosoides</i> L. <i>Ch. murale</i> L. <i>Ch. quinoa</i> Willd.	L: N L: NR L: N L: N	L: N L: NR L: N L: N	L: N L: NR L: N L: N
<b>Compositae Giseke</b>			
<i>Senecio erucifolius</i> L. <i>Zinnia elegans</i> Jacq.	— —	— —	L: ClSp; S: ClVe, CIMot, Dis L: ClSp; S: ClSp
<b>Solanaceae Juss.</b>			
<i>Capsicum annuum</i> L, сорта:			
Виктория	S: ClSp	S: M	S: ClSp
Ласточка	S: M	S: CIM	S: M
Подарок Молдовы	—	S: CIM	S: CIM
<i>Datura ferox</i> L.	L: N	L: N	L: N
<i>D. stramonium</i> L.	L: N	L: N	L: N
<i>Hyosциamus niger</i> L.	L: NSp; S: CIM, Dis	L: NSp; S: ClSp, Dis	S: CIM
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., сорта:			
Белый налив	S: M	S: M, Dis	S: M, Dis
Волгоградский	S: CIM	S: M	S: CIM,
Одиссей	S: M	S: M	S: M, Dis
Сен-Пьер	S: CIM	S: M, Dis	S: M
Талалихин	S: M	S: M	S: M
Хабаровский-308	S: CIM, Dis	S: M, Dis	S: M
Эхо	S: CIM, Dis	S: M, Dis	S: ClSp



Растения семейства, вида, сорта	ВТМт/х	ВТМб/х	ВТМк
<i>Nicotiana alata</i> Link et Otto.	L: N	L: N	L: N; S: CIMot, Dis
<i>N. debnei</i> Domin.	S: CIVe, CIMot	S: CISp	L: CISp
<i>N. fruticosa</i> L.	L: N	L: N	S: M, Dis
<i>N. glutinosa</i> L.	L: N	L: N	L: N
<i>N. rustica</i> L.	L: N	L: N	L: N; S: Dis, CISp
<i>N. tabacum</i> , L., cvs.: Samsun	S: RM	S: M	S: M, Dis
Xanthi	L: N	L: N	L: N
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	L: N	L: N	S: CISp
<i>Physalis franchetii</i> Masters	—	S: CISp	—
<i>Solanum melongena</i> L., сорта:			
Вэратик	S: O	S: O	S: O
Донской	S: CISp	S: O	S: O
Квартет	S: CLSp, Dis	S: M	S: O
Сериял	S: M	S: M, Dis	S: O
Универсал	S: O	S: O	S: O
<i>S. nigrum</i> L.	S: CISp, M, Dis	—	—

Изолят из баклажана также имел свои характерные особенности. Так, у растений *G. globosa* он вызывал на инокулированных листьях некротические пятна и системную мозаику. Кроме того, данным изолятом удалось заразить растения фасоли *Ph. franchetii*.

Вирусные изоляты не удалось передать на следующие виды тест-растений: *A. caudatus*, *A. majus*, *A. belladonna*, *C. pepo*, *C. sativus*, *F. bona*, *Nicotiana paniculata* L., *Pisum sativum* (L.) Cov., *R. sativus*, *Senecio bicolor* (Willd) Tod, *V. sinensis*.

Исследуемые приамурские изоляты из томата и баклажана вызывали у растений *N. alata*, *N. rustica* и *P. hybrida* только локальный некротический ответ, что позволяло нам отнести их к группе томатных штаммов ВТМ. Ранее штаммы из этой же группы были выявлены на томате и баклажане в Приморском крае (Gnutova et al., 1998; Гнутова И., 2000).

Корейский изолят ВТМ (ВТМк), выявленный на томате и любезно предоставленный северокорейскими коллегами из Пхеньяна, имел ряд оригинальных особенностей. В частности, им поражались тест-растения из семейства *Compositae* – *S. erucifolius* и *Z. elegans* (рис. 124). Они реагировали на заражение локальной и системной хлоротичной крапчатостью и хлорозом жилок. Симптомы, индуцируемые ВТМк у тест-растений, были характерными для табачной группы ВТМ, а не томатной.

Различную групповую принадлежность вируса подтверждают результаты изучения физических свойств исследуемых изолятов. Они отличаются от приведенных выше, а также и выявленных ранее изолятов на томате (ВТМт) и баклажане (ВТМб) в Приморском крае (табл. 52).

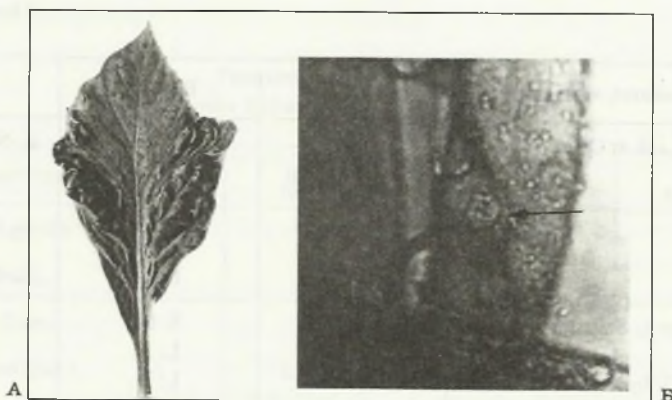


Рис. 124. Мозаика и деформация листа *S. erucifolius* (А) и гексогональная пластинка (указана стрелкой) в клетках эпидермиса листьев *N. tabacum* cv. Samsun (Б), инокулированных корейским изолятом ВТМ

Согласно более ранним исследованиям штаммы ВТМ четко отличаются друг от друга по характеру вирусиндуцированных включений (Гольдин, 1963; Толкач, 1995; Богунов, 2000; Гнутова И.В., 2000). Различия показаны и для внутриклеточных включений, образуемых изолятами ВТМт/х, ВТМб/х и ВТМк. ВТМт/х индуцировал образование в клетках эпидермиса растений *N. tabacum* cv. Samsun удлиненных кристаллов и аморфных включений округлой формы. В клетках эпидермиса растений, зараженных ВТМб/х, были обнаружены только околядерные Х-тела (рис. 125). При инокуляции же ВТМк в клетках образовывались кристаллы с гранями почти равной длины, характерные для табачной группы ВТМ.

На основании полученных данных по изучению круга растений-хозяев, характера симптомов, физических свойств и типа внутриклеточных включений был сделан вывод о том, что ВТМт/х, ВТМб/х, ВТМк являются самостоятельными штаммами *Tobacco mosaic virus*.

Таблица 52

Физические свойства изолятов ВТМ

Изоляты ВТМ	ТТИ, °С	ПСИ	ПРС
ВТМт/х	97	> 4 мес	$10^{-6}$
ВТМб/х	95	> 4 мес	$10^{-7}$
ВТМк	97	—***	$10^{-7}$
ВТМтп*	90	> 2 мес	$10^{-11}$
ВТМбп*	85	> 2 мес	$10^{-12}$
ВТМоб**	90–93	Около 1 года	$10^{-6}$

\*По: Гнутова И.В., 2000. \*\*По: Власов, 1992. \*\*\*Данных нет.



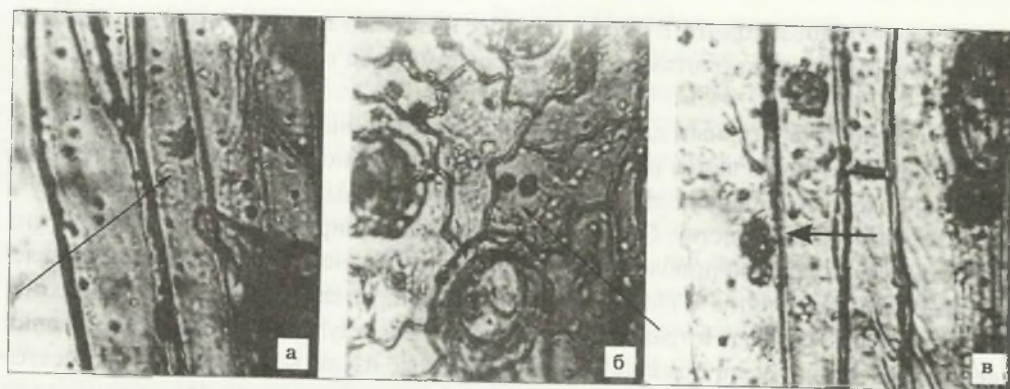


Рис. 125. Внутриклеточные включения амурских изолятов ВТМ: а – гексагональная пластинка и околоядерное Х-тело; б – включения в клетках эпидермиса листьев *N. tabacum* cv. Samsun, инокулированных изолятом ВТМ из томата; в – аморфные околоядерные включения, образованные изолятом ВТМ из баклажана

Была получена моноштаммовая антисыворотка против ВТМт/х. Ранее на российском Дальнем Востоке иммуногенные свойства томатного штамма не изучались. Было показано, что ВТМт/х является хорошим иммуногеном. Титр специфической антисыворотки в РДД составил 1:128 (рис. 126). Исследование антигенных отношений изучаемых штаммов ВТМ показало, что ВТМт и ВТМб близкородственны. В РДД они формировали сходные полосы преципитации, что свидетельствует о наличии на поверхности их капсидных белков идентичных эпитопов (рис. 126).

По всей видимости, капсидный белок корейского штамма ВТМ имеет собственные эпитопы, вследствие чего четкая линия преципитации между ним и антисывороткой против ВТМт/х не формировалась. Вместе с тем иммунохимический анализ свидетельствует о том, что данный изолят также принадлежит к виду ВТМ. В РДД данный штамм реагировал с моноштаммовыми антисыворотками против штаммов ВТМпн и ВТМб (приморские изоляты), ВТМ-У<sub>1</sub> и смеси штаммов ВТМ.

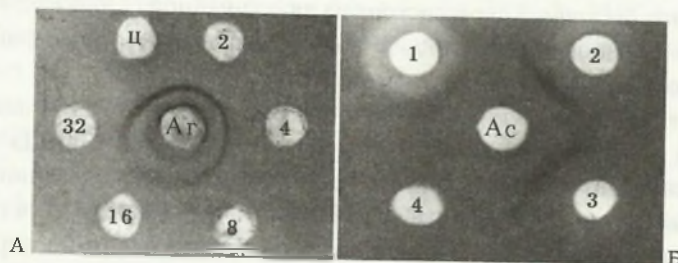


Рис. 126. Титр специфических антител против ВТМт (А) и изучение антигенного родства штаммов ВТМ (Б) методом РДД. А: в центре – Аг (концентрация 1 мг/мл), по периферии – разведения Ас; Б: в центре – Ас против ВТМт, по периферии – препараты штаммов (концентрация 1 мг/мл): 1 – ВТМк, 2 – ВТМт, 3 – ВТМб, 4 – контроль (сок здоровых растений)

Таблица 52

ПРС
10 <sup>-4</sup>
10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-7</sup>
10 <sup>-11</sup>
10 <sup>-12</sup>
10 <sup>-4</sup>

Итак, установлено, что ВТМт/х, ВТМб/х и ВТМк являются самостоятельными штаммами. Приамурские штаммы пополнили томатную группу ВТМ, а ВТМк – табачную.

Согласно литературным данным и нашим собственным исследованиям ВТМ поражает большое число видов растений из различных семейств и тем самым наносит огромный экономический ущерб растениеводству, главным образом овощеводству и декоративному цветоводству. Поэтому изучение этого вируса и его изолятов до сих пор остается актуальной проблемой. Только на юге Дальнего Востока России выявлено уже более 20 изолятов ВТМ, поражающих перец, томаты, баклажаны, декоративные культуры, картофель и травянистые растения, и в результате новых исследований число их ежегодно увеличивается. Дальневосточные изоляты вируса ВТМ относятся к нескольким группам вируса – томатной, табачной, некротической. В зависимости от принадлежности к определенной группе ВТМ изоляты различаются по своей вредности и распространенности.

### Род *Tobravirus*

Род тобравирусы немногочислен (3 вида), название происходит от названия вируса погремковости табака *Tobacco rattle virus*.

**Свойства вирионов. Морфология.** Частицы – прямые трубочки со спиральной симметрией (ход спирали 2,5 нм) двух видов: длинные (L) – 180–215 нм и короткие (S) – 46–115 нм, диаметр частиц – 21,3–23,1 нм, по данным электронной микроскопии, и 20,5–22,5, по данным X-лучевой дифракции. Центральный канал имеет диаметр 4–5 нм.

**Физико-химические и физические свойства.** М.м. вириона 48–50 кДа (L-частиц) и 11–29 кДа (S-частиц), плавучая плотность в CsCl – 1,306–1,324 г/см<sup>3</sup>, коэффициент седиментации  $S_{20,W}$  286–306 S для L-частиц и 155–245 S для S-частиц. Вирионы устойчивы при разных рН и ионных воздействиях, ко многим органическим растворителям, но чувствительны к ЭДТА.

**Нуклеиновая кислота.** Геном состоит из двухлинейной (+)онРНК: РНК 1 длиной 6,8 т.п.о. и РНК 2 длиной 1,8–4,5 т.п.о., 5'-конец кепирован структурой  $m^7G^5ppp^5Ap...$ , 3'-конец не имеет поли(А).

**Белки.** Есть один структурный белок с м.м. 22–24 кДа. РНК 1 вируса погремковости табака кодирует четыре неструктурных белка: белок 134 кДа терминируется слабым стопкодоном; белок 194 кДа образуется при просчитывании этого кодона (оба эти белка вовлекаются в репликацию РНК); белок 29 кДа является транспортным белком; функция белка 16 кДа неясна. У вируса раннего побурения гороха *Pea early browning virus* аналогичные белки имеют м.м. 141, 201, 30 и 12 кДа. РНК 2 кодирует структурный белок, а у некоторых видов и штаммов – неструктурный белок 29–30 кДа с неизвестными функциями.

**Липиды и углеводы** не обнаружены.



**Организация и репликация генома.** РНК 1 независимо реплицируется и транскрибируется в растении, с нее непосредственно транслируются белки 134/141 и 194/201 кДа, тогда как белки 29/30 и 16/12 кДа – с субгеномных РНК. РНК 2 не имеет матричной активности, поэтому белок оболочки и неструктурный белок 29–30 кДа транслируются с субгеномной РНК. Вирионы аккумулируются в цитоплазме и иногда образуют агрегаты типа X-тел вблизи митохондрий и вместе с ними.

**Антигенные и биологические свойства.** Вирусы обладают средней иммуногенной активностью. Антигенное родство между видами слабое или отсутствует даже между изолятами одного вируса. Круг растений-хозяев широкий как среди однодольных, так и среди двудольных растений. Природными переносчиками являются нематоды родов *Trichodorus* и *Paratrachodorus* (разные виды у разных вирусов и их штаммов). Переносчики сохраняют вирус в течение длительного периода. У некоторых растений-хозяев вирусы передаются семенами. Некоторые вирусы поражают растения системно, другие локализируются в местах первоначального заражения. Отдельные изоляты тобравирусов образуют нормальные частицы при инокуляции растений (изоляты М-типа), другие содержат только РНК 1 и не образуют частиц, с трудом передаются при инокуляции соком и не передаются нематодами (изоляты NM-типа).

### Вирус погрешности табака

#### *Tobacco rattle virus*

Вирус погрешности табака (ВПТ) имеет палочковидные вирионы двух типов в зависимости от штамма, их длина 46–114 (штамм Т) и 180–215 нм (штамм В), ширина 22 нм. Полный инфекционный процесс происходит в растениях только при участии частиц обоих типов, ибо генетическая информация, необходимая для репродукции вируса, сосредоточена в них. РНК в крупных частицах влияет на синтез вирионов вируса, а в мелких частицах закодирована структура вирусного белка обоих типов частиц.

РНК 1 и РНК 2 находятся в трубчатых частицах длиной 180–215 нм. Молекулы +(он)РНК имеют м.м. 2,4 мДа (РНК 1) и 0,6–1,4 мДа (РНК 2). РНК 1 инфекционна, РНК 2 нет, но содержит цистрон для белка оболочки. Обе РНК необходимы для продукции длинных (Д) и коротких (К) частиц.

М.м. двух типов частиц вируса составляет 48–50 (Д) и 11–29 (К) кДа. Плавающая плотность в CsCl – 1,306–1,324 г/см<sup>3</sup>, коэффициент седиментации  $S_{20,w}$  296–306 S (Д) и 155–245 S (К). Частицы достаточно стабильны. Д-частицы накапливаются на ранних стадиях инфекционного процесса, в то время как К-частицы имеют тенденцию накапливаться на поздних стадиях.

Круг растений-хозяев широкий, от декоративных до экономически важных культуриваемых овощных растений (картофель, томаты, перец, свекла). Вирус поражает до 400 видов растений и в зависимости от растения-хозяина имеет кроме ВПТ и другие названия: раттл вирус табака, внутренний некроз клубней картофеля, вирус

пестростебельности, курчавой полосатости табака. Симптомы, вызываемые вирусом на растениях, чрезвычайно многообразны (рис. 127). Например, на инокулированных листьях табака развиваются коричневые местные некрозы, затем резкие системные на лепестках.

У гладиолуса вирус вызывает зарубки и узорчатый рисунок на листьях, на тюльпане – темную штриховатость, для астр и перцев характерна кольцевая пятнистость на листьях, желтые пятна проявляются на листьях сахарной свеклы. Вирус заражает гиацинт, салат латук, нарциссы и др. Отмечается также латентное вирусоносительство (Билай и др., 1988).



Рис. 127. Симптомы вируса погречковости табака на *Nicotiana clevelandii* (фото Ю.А. Варищева)

Симптомы вирусного заражения картофеля проявляются весьма разнообразно, особенно на листьях, которые обычно уменьшаются в размерах и на них наблюдаются разные виды мозаик, мраморность, волнистость их краев, курчавость. У некоторых сортов картофеля на стеблях и жилках листа появляются удлиненные, иногда прерывистые коричневые или аспидно-серые штрихи вдавленной некротической ткани. Жилки отмирают или дегенерируют, рост их приостанавливается, а рост ткани между жилками продолжается. Листья становятся волнистыми или сморщенными, с сильно загнутыми краями. Симптомы на картофеле варьируются. Часто на листьях развиваются мозаика и деформация (обыкновенная, желтая в виде светло-зеленых и светло-желтых пятен). Возможно появление некроза жилок листьев, черешков и стеблей. Растения отстают в росте. В мякоти клубней обнаруживаются некрозы в виде колец, полуколец и дуг, последние располагаются концентрически, одна за другой. Иногда эти некрозы видны через кожуру. При сильной степени заражения клубни деформиру-

ются, ста  
птомы пр  
мов на бо  
температу

Извест

птомов на  
фельный

Диаметр

поражени  
(бессимп  
одно из ду  
руса при  
поражени  
ческим тел

Имеет

Наиболее

В ест

*Trichoderma*

*P. napus*, *P.*

и многолет

сутьства

виоферма

са, в том

стране;

и с помо

способ пер

ется по ра

Вирус

На север

желтушн

щивания

Повышен

практику

Вред

который

тренного

урожая

ВТТ

и амери

(Harrison



ются, становятся уродливыми. Особенностью вируса является то, что вирусные симптомы проявляются не на всех стеблях куста и не на всех клубнях. Появление симптомов на ботве не всегда сопровождается поражением клубней, и наоборот. Обычно при температуре выше 20 °С симптомы становятся менее выраженными.

Известно несколько штаммов вируса, которые различаются по характеру симптомов на картофеле и тест-растениях при искусственном заражении. Раньше картофельный штамм считали типичным штаммом вируса.

Диагностические виды растений: *Ch. amaranticolor* (локальные, некротические поражения), *Cucumis sativum* (локальные некротические поражения), *N. clevelandii* (бессимптомно или незначительные хлоротические и некротические поражения) – одно из лучших растений, которое используется для накопления и размножения вируса при получении очищенного препарата, *Ph. vulgaris* (точечные некротические поражения, появляются на 1–3-й день) – одно из лучших тест-растений при биологическом тестировании.

Имеются различные литературные данные по физическим свойствам вирионов. Наиболее широко встречаемые данные: ТТИ – 75–80 °С, ПРС –  $10^{-4}$ , ПСИ – 4 сут.

В естественных условиях вирус переносится через почву 9 видами нематод *Trichodorus* ssp. и *Paratrichodorus*: *T. minor*, *T. primitivus*, *T. viruliferous*, *P. anemones*, *P. nanus*, *P. teres* и др. Нематоды питаются на корнях и стеблях многих однолетних и многолетних растений. Взаимодействие вируса и нематод персистентно. При отсутствии растения-хозяина сами нематоды и инфицированная ими почва сохраняют вирофорность до 5 лет. Почва – основное хранилище и среда распространения вируса, в том числе с помощью гриба *Olpidium brassicae*. Другую главную роль в распространении вируса играют семена зараженных растений. Вирус способен передаваться и с помощью стеблевых прививок, и механически соком, и контактно, но последний способ передачи не имеет большого значения, так как вирус медленно распространяется по растению.

Вирус принадлежит к возбудителям типичных природно-очаговых заболеваний. На северо-западе России резерваторами инфекции являются лопушник, клевер белый, желтушник, вьюнок, подорожник. Так, заражение картофеля происходит при выращивании его в природных очагах этого вируса – *Cirsium arvensis*, *Sonchus arvensis*. Повышенное распространение вируса отмечается на индивидуальных участках, где практикуется монокультура (Власов, Самсонова, 2005).

Вредоносность этого вируса складывается из незначительных потерь урожая, который снижается до 10–20 %, и ухудшения качества клубней. Клубни из-за внутреннего некроза непригодны для пищи (Блоцкая, 1989). По другим данным, потери урожая картофеля от вируса могут составить от 15 до 70 % (Анисимов, 2004).

ВПТ относится к средним иммуногенам. Между европейскими, японскими и американскими изолятами отмечены небольшие отличия в антигенном родстве (Harrison, 1970).

В Приморском крае ВПТ обнаружен только на картофеле (Рейфман, Рущкова, 1978). Авторы наблюдали на ряде сортов картофеля симптомы в виде хлоротичности, плосковидности, посветления краев листьев с последующей некротизацией, отдельные некрозы на стеблях. Иногда вирус визуально не проявлялся, а присутствовал в растении в скрытой форме. При инокуляции вирусом растений гомфрены шаровидной на листьях образовывались крупные некрозы с антоциановым окаймлением, а на табаке сорта Самсун 47/10 – некрозы системного характера на листьях. На табаке клейком симптомов авторы не наблюдали. Антисыворотка, полученная из Института картофельного хозяйства (Московская область), специфически реагировала с дальневосточным изолятом вируса в КА.

В электронном микроскопе наблюдали нитевидные вирионы двух видов, разных по размерам. Изученных свойств было достаточно для утверждения авторами, что они обнаружили на картофеле дальневосточный изолят вируса погремковости табака.

Та  
Сво  
фекцион  
в Прим  
русос ра  
Дал  
показано  
номичес  
декорат  
около 50  
но их ле  
идентиф  
детельст  
сточных  
их шта  
столетия  
оказало  
ражающ  
номные  
новый в  
и для Р  
капусты  
*Caulimo*  
(Глутова  
2001). П  
явлены  
ства пр  
каулима  
качанно  
щихся в  
Отличия  
так и фи  
вание с  
Рас  
лись мид  
вируса в



## Таксономический статус дальневосточных изолятов вирусов растений

Своеобразие геоклиматических условий юга ДФО определяет повышенный инфекционный фон в био- и агроценозах, причем самый агрессивный патогенный фон – в Приморском крае, где отмечено наибольшее количество идентифицированных вирусов растений (рис. 128).

Дальневосточными фитовирусологами уже с конца 50-х годов прошлого века показано, что в регионе циркулируют вирусы растений, поражающие важные в экономическом плане с/х культуры – овощные, картофель, злаковые, бобовые, а также декоративные, сорные и дикорастущие растения. К настоящему времени выявлено около 50 вирусов и еще больше изучено их изолятов и штаммов. Результаты идентификации последних 15 лет свидетельствовали о наличии в дальневосточных агро- и биоценозах вирусов и их штаммов, не изученных в прошлом столетии (Гнutowa, 2005). Например, оказалось, что овощные культуры поражаются не только РНК-, но и ДНК-геномными вирусами. Идентифицирован новый вид не только для ДВ региона, но и для России – вирус мозаики цветной капусты *Cauliflower mosaic virus* рода *Caulimovirus* семейства *Caulimoviridae* (Gnutova, Tolkach, 2000; Толкач, Гнutowa, 2001). Причем в Приморском крае выявлены из культурных растений семейства крестоцветных 8 изолятов этого каулимовируса (капусты цветной и белокочанной, редиса и дайкона), различающихся по фенотипическим параметрам. Отличия изолятов как по биологическим, так и физическим свойствам дали основание сделать предположение об измен-

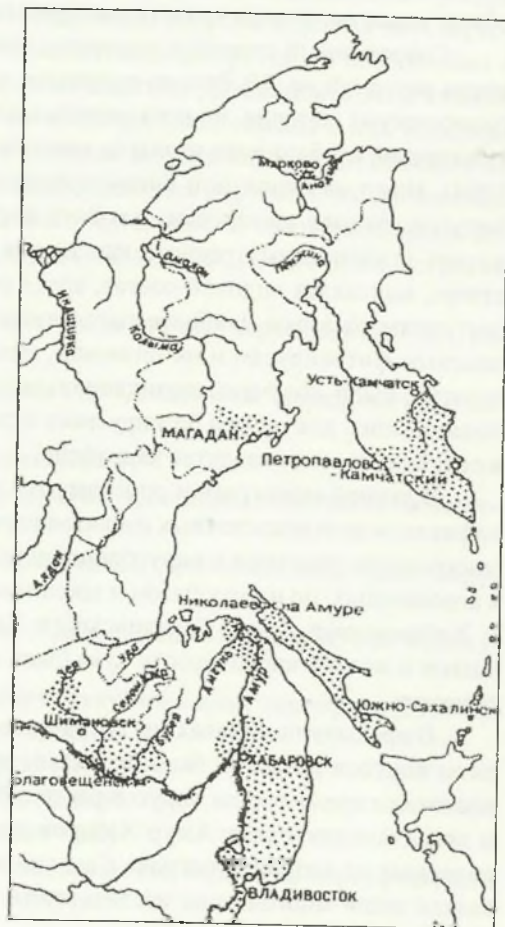


Рис. 128. Районы ДВ России, где проводились маршрутные обследования по выявлению вирусов растений

чивости ВМЦК в ДФО. Изучение особенностей генетической изменчивости изолятов ВМЦК позволило разработать эффективные диагностические тесты на основе антигенных свойств капсидных белков и вирусных нуклеиновых кислот. В последние годы для этих целей используют молекулярные методы детекции вирусной ДНК по причине их высокой чувствительности и специфичности. Разработанный за рубежом радиоактивно-гибридизационный метод выявления ВМЦК довольно перспективен, однако в практике он не нашел применения главным образом из-за трудоемкости и необходимости соблюдения строгих мер безопасности (Maule et al., 1983). Более доступным, по нашему мнению, может стать его вариант с использованием нерадиоактивных зондов (Gnutova, Tolkach, Bogunov, 2002). Выявление промотора 35S РНК ВМЦК в трансгенных растениях с помощью ПЦР со специфическими праймерами оказалось быстрым и доступным (Melnychuk et al., 2002), что свидетельствовало о перспективности и этого метода. Необходимо отметить также, что изучение изменчивости ВМЦК – актуальная задача не только для вирусологии, но и для генной инженерии, которая успешно использует геном вируса и его фрагменты как модельные объекты для получения трансгенных растений.

Современный подход к изучению вновь выявленных в био- и агроценозах вирусов растений на ДВ России опирается не только на комплекс классических вирусологических методов, но и на методы молекулярной биологии, поскольку все фенотипические особенности изолятов генетически детерминированы (Chenault, Melcher, 1994). Нами на основании биологических особенностей дальневосточных изолятов вирусов, физико-химических свойств вирусспецифических белков и нуклеиновых кислот и антигенных свойств капсидных белков определялся их таксономический статус, выявлялся видовой состав, ареал распространения, уровень специализации к растениям-хозяевам наиболее патогенных и вредоносных вирусов. К наиболее опасным фитовирусам и их штаммам, наносящим существенный ущерб урожаю с/х культур, были получены поликлональные антисыворотки, которые многие годы использовались для отбора безвирусного исходного посадочного материала в основном в селекции и семеноводстве картофеля.

В данной монографии описываются свойства вирусов и их штаммов. Для идентификации дальневосточных изолятов вирусов использовались образцы однолетних и многолетних растений с вирусоподобными заболеваниями, выращиваемые не только в агроценозах, но и в открытом и закрытом грунте, а также в биоценозах Приморского и Хабаровского краев, Сахалинской и Камчатской областей. Вирусы заукливания злаков и желтой карликовости лука были обнаружены в Новосибирской и Иркутской областях.

В предыдущих главах мы обсудили критерии, по которым дальневосточные изоляты вирусов растений были отнесены к определенному виду, роду и семейству. В настоящее время состав вирусов растений наиболее полно изучен в Приморском крае и прилегающих к реке Амур Хабаровском крае и Амурской области, менее – на отдаленных от материка острове Сахалин и полуострове Камчатка (рис. 128). Как показали наши многолетние исследования, изменчивость отдельных дальневосточных



видов чрезвычайно высока. Например, выявлено около 20 изолятов ВТМ, большое видовое разнообразие характерно и для самого распространенного на овощных культурах и декоративных растениях вируса огуречной мозаики, а также вируса желтой мозаики фасоли, поражающего бобовые, овощные и декоративные культуры, вируса мозаики сои, наиболее опасного и вредоносного в посевах сои, и др.

Академик РАСХН А.К. Чайка (2003), выступая на Международной практической конференции в Москве, отметил: «Дальневосточный регион России – один из самых крупных в стране. Площадь его 6,2 млн. км<sup>2</sup> в том числе 3 млн. гектаров пахотных земель, население более 7 млн. человек. Учитывая отдаленность от центральных районов России и нестабильность погодных условий, здесь должна быть своя стратегия в развитии сельскохозяйственного производства. В южных и центральных районах региона главное внимание должно быть акцентировано на возделывании таких важных культур, как рис и соя. Что касается производства картофеля и овощей, то их можно выращивать во всех зонах дальневосточного региона. При этом в семеноводстве решается важная задача в связи с поражением картофеля вирусными болезнями». На ДВ развитие фитовирусологии началось именно с изучения вирусов, поражающих картофель. Вегетативный способ размножения способствовал резервации и накоплению в нем вирусов. Вирусные инфекции существенно снижали урожайность этой ценной продовольственной культуры и ухудшали качество клубней, снижая в них содержание крахмала и витамина С. Поэтому уже в то время актуальной задачей являлось не только изучение вредоносности и патогенности отдельных вирусов и их смешанных инфекций, но и получение здорового семенного материала. В настоящее время известно около 40 вирусов, поражающих картофель (Salazar, 2003), но в разной степени влияющих на его урожайность:

*Potato leafroll virus (PLRV)* – вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК), синоним: L-вирус картофеля

*Potato virus Y (PVY)* – Y-вирус картофеля (YBK), синонимы: морщинистая и полосчатая мозаика картофеля

*Potato virus A (PVA)* – A-вирус картофеля (ABK)

*Potato virus X (PVX)* – X-вирус картофеля (ХБК), синоним: крапчатая (обыкновенная, мягкая) мозаика картофеля

*Potato virus M (PVM)* – M-вирус картофеля (МБК), синоним: мозаичное закручивание листьев картофеля

*Potato virus S (PVS)* – S-вирус картофеля (SBK), синоним: обыкновенная и складчатая мозаика картофеля

*Potato aucuba mosaic virus (PAMV)* – вирус аукуба мозаики картофеля (ВАМК), синоним: *potato virus F (PVF)* – F-вирус картофеля

*Potato virus U (PVU)* – U-вирус картофеля (UBK)

*Potato virus T (PVT)* – T-вирус картофеля (ТБК)

*Potato virus V (PVV)* – V-вирус картофеля (VBK)

*Potato mop-top virus (PMTV)* – вирус метельчатости верхушки картофеля, или моп-топ картофеля (ВМБК)

*Potato yellow dwarf virus (PYDV)* – вирус желтой карликовости картофеля (ВЖКК)

*Potato rough dwarf mosaic virus (PRDMV)* – вирус курчавой карликовой мозаики картофеля (ВККМК)

*Potato yellow vein virus (PYVV)* – вирус пожелтения жилок картофеля (ВПЖК)

*Potato black ringspot virus (PBRV)* – вирус черной кольцевой пятнистости картофеля (ВЧКПК)

*Wild potato mosaic virus (WPMV)* – вирус мозаики дикого картофеля (ВМДК)

*Potato deforming mosaic virus (PDMV)* – вирус деформирующей мозаики картофеля (ВДМК)

*Andean potato latent virus (APLV)* – Андийский латентный вирус картофеля (АЛВК)

*Andean potato mottle virus (APMoV)* – Андийский вирус крапчатости картофеля (АВКК)

*Arracacha virus B strain Oca (AVBo)* – вирус арракача В (штамм Ока)

*Tobacco mosaic virus (TMV)* – вирус табачной мозаики (ВТМ)

*Tobacco rattle virus (TRV)* – вирус погромковости табака (ВПТ), синонимы: ратлл-вирус, R-вирус, или вирус внутреннего некроза клубней; кольцевая пятнистость; некроз клубней и крапчатость стебля картофеля; вирус пестростебельности табака

*Tobacco necrosis virus (TNV)* – вирус некроза табака (ВНТ)

*Tobacco streak virus (TSV)* – вирус полосчатости табака (ВПТ)

*Tobacco etch virus (TEV)* – вирус гравировки табака (ВГТ)

*Tomato black ring virus (TBRV)* – вирус черной кольцевой пятнистости томатов (ВЧКПТ), или букетообразности картофеля

*Tomato spotted wilt virus (TSWV)* – вирус бронзовости томата ВБТ, синоним: вирус пятнистого увядания томатов

*Solanum apical leaf curling virus (SALCV)* – вирус курчавости верхушки листьев паслена (ВКВЛП)

*Solanum yellow virus (SYV)* – вирус пожелтения паслена (ВПП)

*Alfalfa mosaic virus (ALMV)* – вирус мозаики люцерны (ВМЛ), синоним: мраморность (калик), или *Potato pseudo-aucuba virus*

*Cucumber mosaic virus (CMV)* – вирус огуречной мозаики (ВОМ)

*Beet curly top virus (BCTV)* – вирус курчавой верхушки свеклы (ВКВС)

*Beet midl yellowing virus (BMVYV)* – вирус слабого пожелтения свеклы, или западной желтухи свеклы (ВЗЖС)

*Papaya mosaic virus (PapMV)* – вирус мозаики папайи (ВМПпап)

*Pepino mosaic virus (PepMV)* – вирус мозаики пепино (ВМПпеп)

*Eggplant mosaic dwarf virus (EMDV)* – вирус желтой мозаичности баклажана (ВЖМБ)

*14 R virus (14R)* – 14 эР вирус и др.

Сейчас в мире самыми опасными и наиболее распространенными на картофеле вирусами являются: вирус скручивания листьев картофеля, Y-, A-, X-, M-вирусы



картофеля (Salazar, 2003). В настоящее время для посадок картофеля во многих странах Европы особо опасен ЮВК, который вызывает значительные потери урожая, но самое главное, в последние годы вирус мутирует с образованием новых вредоносных штаммов. Эти штаммы и могут стать серьезной угрозой для картофелеводства во всем мире. В последние годы в связи с все возрастающим сортообменом картофеля появилась реальная угроза проникновения и распространения этих штаммов ЮВК на территории России.

В ДВ регионе на картофеле идентифицировано 11 вирусов: помимо пяти перечисленных выше вредоносных вирусов, это вирусы аукуба мозаики картофеля, погрелковости табака, S-вирус картофеля, вирус мозаики люцерны, вирусы табачной и огуречной мозаики (Рейфман, Гнутова, Романова, 1996) (табл. 53).

Таблица 53

Вирусы и их штаммы, поражающие картофель в ДВ регионе России

Семейство	Род	Вид (симптомы на картофеле)	Штамм
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfavirus</i>	Вирус мозаики люцерны (желто-белая мозаика сформировавшихся листьев)	
	<i>Cucumovirus</i>	Вирус огуречной мозаики (хлоротичность и крапчатость листьев)	Обычный
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	A-вирус картофеля (складчатая мозаика)	
		Y-вирус картофеля (морщинистая полосатая мозаика)	Обычный, некротический
<i>Flexiviridae</i>	<i>Carlavirus</i>	M-вирус картофеля (мозаичное закручивание листьев)	Среднепатогенный
		S-вирус картофеля (крапчатая или обыкновенная мозаика, бессимптомно)	Среднепатогенный
	<i>Potexvirus</i>	Вирус аукуба мозаики картофеля (яркая желтая пятнистость листьев)	
«Плавающие» роды	<i>Tobravirus</i>	Вирус погрелковости табака (различные типы мозаик и деформация листьев)	
	<i>Tobamovirus</i>	Вирус табачной мозаики (желтая пятнистость)	Картофельный
<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>	Вирус скручивания листьев картофеля	

В настоящее время суровое проявление вирусных инфекций отмечается на коллекционном материале и в массовых товарных репродукциях картофеля. Районированные в Приморье и Приамурье сорта картофеля, а также гибридный селекционный материал и новые сортообразцы картофеля заражены вирусами незначительно, и чаще всего некоторые вирусы проявляются в латентной форме (Толмачева, Анненков, 2004). Такую же ситуацию мы наблюдали в последние годы на Сахалине и Камчатке. Это результат многолетнего оздоровления картофеля с помощью метода апикальной ме-

ристы и применения антивирусных сывороток для выбраковки вирусных растений в ДФО России.

Разработанная система безвирусного семеноводства картофеля, основанная на оздоровлении районированных сортов и ускоренном размножении исходного семенного материала в условиях, исключающих повторное заражение вирусами, успешно решает многие проблемы в выращивании этой важной культуры.

Овощные культуры, как и картофель, поражаются многочисленными вирусами растений, и некоторые из них стали серьезной угрозой при их выращивании. Благодаря комплексному исследованию вирусных болезней и вирусов, их вызывающих, число новых ранее не идентифицированных в ДВ регионе вирусов и штаммов возросло. Главные причины проявления вирусной инфекции – возделывание сортов со слабой устойчивостью к вирусам, появление новых более агрессивных штаммов вирусов, интенсивная неконтролируемая торговля семенами и посадочным материалом, новые возможности диагностики, а также своеобразные климатические условия южных районов, особенно в весенне-летнее время (большой перепад дневных и ночных температур, высокая влажность, а в отдельные годы обилие насекомых-переносчиков, которые создают высокий инфекционный фон). Симптомы вирусного поражения овощных культур зачастую бывает трудно отличить от таких, которые вызывают у растений различные неинфекционные стрессовые факторы, например засуха, холод, длительное переувлажнение, недостаток питательных веществ и другие. Точная диагностика фитопатогенных вирусов в настоящее время стала возможна при дополнении классических методов идентификации современными генно-инженерными и методами иммунохимического анализа – ПЦР и ИФА. В успешном выращивании безвирусного материала овощных культур важнейшую роль играет химическая борьба с насекомыми – переносчиками вирусов. Но самый эффективный метод борьбы с вирусами – селекция устойчивых к вирусам сортов и гибридов. Нами на овощных культурах, возделываемых в южных районах ДФО в агроценозах и тепличных хозяйствах, идентифицировано 15 вирусов (табл. 54).

По географической широте юг ДВ соответствует югу европейской части России. Поэтому в данной зоне широко распространено товарное производство многих овощных культур, главным образом относящихся к трем семействам – Тыквенные *Cucurbitaceae*: кабачок, тыква, огурец, патиссон, арбуз; Пасленовые *Solanaceae*: томаты, баклажаны, перец сладкий; Крестоцветные *Brassicaceae*: виды капусты белокочанной и цветной, редис, лоба, дайкон и др. Перечисленные овощные культуры этих трех семейств часто подвержены вирусной инфекции, но в отечественной литературе сведений об этом крайне мало. Нами на перце обнаружены обычный и некротический штаммы ВТМ, на томате и баклажане (приморские и приамурские изоляты) – томатный штамм этого вируса, на томатах – вирус томатной мозаики, на огурцах – вирус зеленой крапчатой мозаики огурцов. На тыкве и кабачке выявлен вирус мозаики арбуза, на перце, огурце посевном, баклажане, томате, тыкве и др. – обычный штамм вируса огуречной мозаики (дальневосточный серотип), на капусте цветной и кочанной, редисе и дайконе – вирус мозаики цветной капусты. Следует особо подчеркнуть,



**Вирусы, выявленные на овощных культурах (дальневосточные изоляты) и их основные насекомые-переносчики**

Название вируса		Род	Семейство
Русское	Английское		
<b>Переносчики неизвестны</b>			
Вирус табачной мозаики (ВТМ)	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	—
Вирус мозаики томата (ВМТо)	<i>Tomato mosaic virus</i>	—»—	—
Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО)	<i>Cucumber green mosaic virus</i>	—»—	—
X-вирус картофеля (ХВК)	<i>Potato virus X</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Flexiviridae</i>
<b>Перенос вирусов тлями</b>			
Вирус огуречной мозаики (ВОМ)	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
Вирус мозаики турнепса (ВМТ)	<i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
Вирус гравировки табака (ВГТ)	<i>Tobacco etch virus</i>	—»—	—»—
У-вирус картофеля (УВК)	<i>Potato virus Y</i>	—»—	—»—
Вирус обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ)	<i>Bean common mosaic virus</i>	—»—	—»—
Вирус желтой карликовости лука (ВЖКЛ)	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	—»—	—»—
Вирус мозаики арбуза (ВМА)	<i>Watermelon mosaic virus</i>	—»—	—»—
Вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ)	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	—»—	—»—
Вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК)	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>
S-вирус картофеля (SBK)	<i>Potato virus S</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Flexiviridae</i>
<b>Перенос вируса жуками</b>			
Вирус мозаики редиса (ВМР)	<i>Radish mosaic virus</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Comoviridae</i>

что растения семейства *Fabaceae* всегда поражались локально. Это свидетельствует о том, что изученные изоляты не относились к группе бобовых штаммов. На перце также идентифицирован вирус гравировки табака, на луке – вирус желтой карликовости лука, на тыкве и фасоли овощной, горохе просевном и др. – вирус желтой мозаики фасоли, на фасоли обыкновенной – обычный штамм вируса обыкновенной мозаики фасоли.

На культурных видах растений семейства крестоцветных выявлен обычный штамм вируса мозаики турнепса, американско-японский штамм вируса мозаики редиса. Исследования, проведенные нами по идентификации вирусов на овощных культурах, дополнили список фитовирусов, идентифицированных не только на ДВ, но и в России. Вирусы мозаики арбуза, гравировки табака, мозаики цветной капусты и вирус мозаики редиса – новые для России вирусы растений.

В последние годы возросло распространение вирусных болезней зерновых культур и увеличился экономический ущерб от них. Причина – активный обмен посевным

материалом. К тому же использование методов диагностики ИФА и ПЦР позволило за счет высокой чувствительности и специфичности выявлять в инфекционном материале ранее не диагностируемые вирусы, в результате увеличилось количество известных вредителей. С помощью ИФА в полевом материале, собранном в 2004 г в дальневосточном регионе, были выявлены вирус мозаики костра, вирус штриховатой мозаики ячменя, все типы вируса желтой карликовости ячменя – MAV, PAV, SGV, PMV и штамм RPV вируса желтой карликовости злаков, которые имеют также распространение в европейской части России. При этом на ДВ не обнаружены вирусы на злаках, передающиеся через почву, – вирус полосатой мозаики пшеницы и вирус мозаики пшеницы (личное сообщение К.А. Можяевой, 2006 г.).

С учетом влияния на урожайность злаковых культур различают три группы вирусов (Шпаар и др., 2002). В первую входят вирусы, оказывающие летальное действие (это, например, один из распространенных – вирус желтой карликовости ячменя и почвообитающие вирусы). Одна из последних эпифитотий в нечерноземной полосе России (1990–1993 гг.) была вызвана вирусом желтой карликовости ячменя и привела к потере 90% урожая зерновых на площади в несколько миллионов гектаров. Второй группе вирусы, ослабляющие кушение злаковых, но не влияющие на их рост, поэтому ущерб от них незначителен (например, вирус мозаики костра, обнаруженный впервые в нашем регионе в Амурской области). И в третью входят вирусы, задерживающие рост и усиливающие кушение. Ущерб может быть существенным. Это, например, вирусы карликовости пшеницы и стерильной карликовости овса.

К сожалению, среди вирусов, поражающих зерновые культуры в Дальневосточном регионе, по правилам МКТВ идентифицировано только два циторабдовируса – северной мозаики злаков (российский дальневосточный штамм) и закукливания злаков – и один бромовирус – мозаики костра. В Приморском и Хабаровском краях ВМК и ВСМЗ серьезных опасений не вызывают, но они широко распространены в Амурской области, где сосредоточено 70% всех пахотных земель ДВ. Изучена их симптоматология, круг поражаемых растений-хозяев, морфология вирусных частиц и вирусных включений в инфицированной клетке, физико-химические и антигенные свойства капсидных белков, а для вируса северной мозаики злаков исследована биология его единственного переносчика – темной цикадки *Laodelphax striatellus* F. В настоящее время актуальной является задача, связанная с подтверждением таксономического статуса вирусов, выявленных в последние годы, главным образом по симптомам заболевания на зерновых культурах.

Вирусам, поражающим бобовые культуры, дальневосточными фитовирусологами всегда уделялось много внимания, и прежде всего потому, что юг дальневосточного региона был и остается основным в России, где возделывается соя. В основном посевы сои, как уже отмечалось выше, поражаются вирусом мозаики сои, хотя на бобовых культурах известно более 20 вирусов. На ДВ России идентифицированы вирусы желтой и обыкновенной мозаики фасоли, мозаики белого клевера, вирус задержки роста сои, вирус мозаики клевера горного, вирус деформирующей мозаики гороха 1, вирус крапчатости красного клевера, вирус мозаики горошка однопарного и др.



Фундаментальные исследования по приданию таксономического статуса изученным нами вирусам растений, выявленных в агро- и биоценозах ДВ России, по их сходным свойствам являются отправными для отнесения их к определенному виду, роду и семейству. Идентификация дальневосточных изолятов вирусов по классическим критериям облегчала поиск информации о вновь выявленных видах. Например, антигенные свойства капсидных белков многих вирусов коррелируют с их фенотипическими признаками – морфология и размер вирионов, способы передачи в природе и экспериментальным путем, круг растений-хозяев и характер симптомов на тест-растениях, географическое распространение, патогенность, тканевый тропизм, гистологические и цитологические изменения в клетках пораженных растений и т.д. В настоящее время эти критерии подтверждаются стабильными признаками генома и белков. К геному относятся тип и размер в т.п.о., количество нитей нуклеиновой кислоты, линейность или кольцевидность, полярность, количество и размер сегментов, нуклеотидная последовательность, присутствие элементов с повторяющейся последовательностью, наличие изометрии, соотношение G+C, наличие и тип 5'-концевого кепса, 5'-концевых ковалентно связанных белков, наличие 3'-поли(А)-тракта. Свойства белков: количество, размер и функциональная активность структурных и неструктурных белков, особенности функциональной активности таких белков, как транскриптаза и др., аминокислотная последовательность, гликозилирование, фосфорилирование, картирование эпитопов капсидных белков. Учитываются также свойства липидов и углеводов. Кроме того, в настоящее время для идентификации вирусов растений обязательно используются такие характеристики вируса, как организация и стратегия репликации генома (количество и положение открытых рамок считывания, особенности транскрипции и трансляции, посттрансляционного процессинга, расположение (сайты) аккумуляции вирионных белков и сборки вирионов). Сюда же следует отнести критерии, которые определяют свойства вирусных частиц, – плавучая плотность, коэффициент седиментации, электрофоретическая подвижность.

Исторически сложилось, что устойчивость вируса, определяемая по изменению его инфекционности (часто в соке инфицированных растений), издавна служит одним из критериев по отнесению вируса к определенному роду. Такие свойства вирионов, как ТТИ, ПСИ и ПРС, до сих пор полезны, особенно на первых этапах идентификации вируса.

Биологические свойства вируса, основанные на симптомах и круге растений-хозяев, также важны, так как проявление вирусной инфекции в растении служит выражением активности белков, кодируемых нуклеиновой кислотой. Несмотря на то что это один из трудоемких и объемных методов исследования при изучении вирусов, конечный результат (характер симптомов) является довольно специфическим и точным ответом.

Такой критерий, как морфология вирионов, имеет важное значение при определении таксономического статуса вирусов растений. Сходство в длине вирионов, имеющих удлиненные частицы, отражает сходство в длине нуклеиновой кислоты и в структуре белковой субъединицы, так как этими факторами контролируется спираль-

ная структура частиц. Для целей классификации сферических вирусов морфология частиц не является столь полезной, как в случае палочковидных или удлинённых гибких нитей, так как большинство изометрических вирусов имеют размеры 26–30 нм и, по наблюдениям в электронном микроскопе, внешне сходны. Тем не менее сведения о расположении субъединиц с помощью рентгеноструктурного анализа или электронного микроскопа с высоким разрешением служат важным критерием при таксономии сферических вирусов.

Для выявления вирусов со сложной морфологией вирионов результаты электронной микроскопии служат ценной информацией.

Обсуждая вопрос о критериях, используемых для таксономии вирусов растения, исследователи сталкиваются с общими проблемами: во-первых, важность различных критериев при классификации и, во-вторых, взаимосвязь между разными признаками. Например, замена одного основания в молекуле нуклеиновой кислоты может привести к замене одной аминокислоты в капсидном белке, что, в свою очередь, изменяет антигенную специфичность и электрофоретическую подвижность вируса.

Попытка изучить свойства дальневосточных изолятов вирусов для отнесения их к определенным таксонам (видам) была предпринята нами в 70–80-е гг. прошлого столетия, когда их включили в 10 групп (а ныне родов) (Гнутова, 1993). Эта таксономия базировалась на биологических свойствах вирионов (симптоматология, круг растений-хозяев, морфология и размер вирионов, физические свойства вирионов, передача вирусов и наличие вирусных включений в инфицированной клетке), физико-химических (м.м. вирусных белков и нуклеиновых кислот, коэффициент седиментации вирионов, пептидное картирование и т.д.) и иммуногенных и антигенных свойствах капсидных белков. Причем наряду с классическими методами идентификации для нас особый интерес представлял критерий, основанный на наличии идентичных эпитопов капсидных белков у отдельных видов рода, объединяющих вирусы растений в определенный род. Подобная масштабная работа по антигенным взаимоотношениям вирусов и их штаммов в России не проводилась ни до 90-х годов прошлого столетия, ни после. Антигенные взаимоотношения определялись при сравнении результатов нескольких высокочувствительных и строго специфичных иммунохимических методов количественной иммунохимии.

Ко всем идентифицированным в ДВ регионе России вирусам и многим их штаммам и изолятам были отработаны оптимальные методики получения очищенных вирусных препаратов, которые использовались для определения м.м. структурных белков и для изучения антигенных и иммуногенных свойств капсидных белков методами иммунохимии. Антигенные взаимоотношения определялись с помощью перекрестных иммунохимических реакций. При этом нами при изучении антигенных и иммуногенных свойств капсидных белков использовался весь арсенал методов иммунохимии – от общепринятых в практике, основанных на феномене агглютинации и преципитации (реакция пассивной гемагглютинации, капельная виробактериальная и бентонитная агглютинация, реакция связывания комплемента, иммунодиффузионные тесты), до высокочувствительных методов радиоиммунологического и иммуно-



ферментного анализа, иммунофлюоресценции, иммунной электронной микроскопии. Результаты, полученные с помощью этих методов, дополнялись и подтверждались пептидным картированием, что усиливало их достоверность.

Разработанные нами методические подходы к изучению антигенных свойств капсидных белков (Гнутова, 1993) послужили основой для получения поликлональных антисывороток ко всем изучаемым нами вирусам и их штаммам (табл. 55)

Таблица 55

Поликлональные вируспецифические антисыворотки

Род	Вирус	Антиген (штамм, изолят)
<i>Bromovirus</i>	мозаики горошка однопарного	Изоляты из горошка однопарного: обычный, некротический, пятнистый
	мозаики костра	Изоляты из пырея ползучего, серобородника
<i>Carlavirus</i>	М-вирус картофеля	Изолят из картофеля
	мозаики горошка ложносочевичного	Изолят из горошка ложносочевичного
	S-вирус картофеля	Изолят из картофеля
<i>Caulimovirus</i>	мозаики цветной капусты	Изоляты из дайкона, цветной капусты
<i>Comovirus</i>	мозаики редиса	Изолят из редьки китайской
<i>Cucumovirus</i>	аспермии томатов	Изолят из хризантемы
	огуречной мозаики	Изоляты из гладиолуса, кабачка, картофеля, бобов конских, огурца (дальневосточный), огурца (северо-корейский), примулы, смородины, изолят кавказский*
	задержки роста сои	Изолят из сои
<i>Necrovirus</i>	некроза табака	Изолят из нарцисса
<i>Nepovirus</i>	короткоузлия винограда	Изоляты из винограда*, сорта: Алиготе, Рипариа х Рупестрис № 3309, Сильванер, Шасла белая
<i>Potexvirus</i>	аукуба мозаики картофеля	Изолят из картофеля
	кольцевой пятнистости гортензии	Изолят из гортензии
	мозаики белого клевера	Изолят из клевера
	мозаики подорожника азиатского	Изоляты из подорожника азиатского (приморский, сахалинский)
	X-вирус картофеля	Штаммы из картофеля: «черная кожа» – сильновирулентный, таежный – средневирулентный, уссурийский – слабовирулентный
<i>Potyvirus</i>	A-вирус картофеля	Изолят из картофеля
	гравировки табака	Изолят из перца
	желтой мозаики фасоли	Изоляты из гладиолуса, тыквы, кабачка, фасоли
	желтой карликовости лука	Изолят сибирский из лука-шалота

Род	Вирус	Антиген (штамм, изолят)
<i>Potyvirus</i>	обыкновенной мозаики фасоли	Изоляты из фасоли (дальневосточный, северо-корейский, китайский)
	мозаики арбуза	Изоляты из тыквы, кабачка
	мозаики гиппеаструма	Изолят из гиппеаструма
	мозаики клевера горного	Изолят из клевера
	мозаики сои	Изолят из сои
	мозаики традесканции белоцветковой	Изолят из традесканции белоцветковой
	мозаики турнепса	Изолят из лобы китайской
	У-вирус картофеля	Штаммы из картофеля: некротический (УВК <sup>N</sup> ), обычный (УВК <sup>O</sup> ) и УВК <sup>C</sup>
<i>Cytorhabdovirus</i>	закукливания злаков	Полевой материал овса
	северной мозаики злаков	— « —
<i>Tobamovirus</i>	табачной мозаики	Изоляты из баклажана, белены, зорьки, душистого табака, ириса, казахский* Штаммы из нарцисса (некротический), нарцисса (мозаичный), обычный*, «ОМ»**, перцевый (некротический), перцевый (обычный), петлевидный*, петуниевый, подорожниковый*, томатный (приморский), томатный (приамурский), фибриллярный*, цифомандровый*, ядерный «О»*, ядерный «Т»*
	зеленой крапчатой мозаики огурца	Изолят из огурца
<i>Tenuivirus</i>	штриховатой мозаики риса	Полевой материал риса

Примечание. Штаммы ВТМ предоставлены: \*Т. Подъяпольской, \*\*Ю. Н. Журавлевым.

Для получения активных строго специфичных антител проводился тщательный отбор каждого из факторов, влияющих на иммуногенез животного – иммуногенность капсидных белков, схема иммунизации, доза иммуногена и способ его введения, подбор адьюванта и реиммунизация. На примере вирусов из различных родов нами было установлена целесообразность отказа от иммунизации животных дозами свыше 1 мг за одну инъекцию. Это позволяло более рационально использовать очищенный препарат вируса и, самое главное, при такой дозе иммуногена вырабатывались антитела высокой avidности.

Кроме того, нами показано существенное преимущество внутрикожного и подкожного введения иммуногена в места расположения лимфоузлов по сравнению с распространенными внутривенными и внутримышечными введениями. Титр специфических антител при таком введении иммуногена повышался на 2–3 порядка.



Разработанные нами схемы иммунизации были использованы для получения не только кроличьих, но и куриных и мышинных антисывороток, например, к вирусу мозаики цветной капусты и некоторым потивирусам.

Были отработаны на дальневосточных видах многие методы постановки иммунохимического анализа для выявления родо-, видо- и штаммоспецифических эпитопов капсидных белков. Первоначально нами использовались достоверные, но мало чувствительные методы – двойная и радиальная иммунодиффузия, позже были применены наглядные и высокоспецифичные – ракетный иммуноэлектрофорез и иммунная электронная микроскопия, а также различные варианты ИФА (прямой, непрямой, сэндвич, конкурентный, двойной антителный сэндвич).

При этом, как свидетельствуют наши исследования, антигенная специфичность капсидных белков полезна при объединении вирусов растений как в определенный род, так и для изучения видового разнообразия вируса.

К концу прошлого столетия в ДВ регионе России было выявлено около 40 фитовирусов и еще больше изучено их изолятов и штаммов. Эти вирусы растений были отнесены к 5 семействам и 16 родам (табл. 56).

Таблица 56

Таксономия фитопатогенных вирусов, идентифицированных на территории азиатской части России (по: Гнутова, Толкач, 2001)

Семейство	Род	Вид
<i>Bromoviridae</i>	<i>Bromovirus</i>	<i>Brome mosaic virus</i>
		<i>Vicia unijuga mosaic virus</i>
	<i>Alfavirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus</i>
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>
		<i>Soybean stunt virus</i>
		<i>Tomato aspermy virus</i>
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caultmovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
		<i>Dahlia mosaic virus</i>
<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Radish mosaic virus</i>
	<i>Nepovirus</i>	<i>Arabis mosaic virus</i>
		<i>Raspberry ringspot virus</i>
<i>Tobacco ringspot virus</i>		
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Tomato ringspot virus</i>
		<i>Bean common mosaic virus</i>
		<i>Bean yellow mosaic virus</i>
		<i>Hippeastrum mosaic virus</i>
		<i>Onion yellow dwarf virus</i>
		<i>Potato virus A</i>
<i>Potato virus Y</i>		
		<i>Soybean mosaic virus</i>

Семейство	Род	Вид
	<i>Potyvirus</i>	<i>Tobacco etch virus</i> <i>Tradescantia albiflora virus</i> <i>Trifolium montanum mosaic virus</i> <i>Turnip mosaic virus</i> <i>Watermelon mosaic virus</i>
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i>	<i>Cereal pupation virus</i> <i>Northern cereale mosaic virus</i>
«Плавающие» роды	<i>Enamovirus</i>	<i>Pea enation mosaic virus 1</i>
	<i>Hordievirus</i>	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
	<i>Carlavirus</i>	<i>Lily symptomless virus</i>
		<i>Potato virus M</i>
		<i>Potato virus S</i>
		<i>Vicia pseudorobus mosaic virus</i>
	<i>Luteovirus</i>	<i>Potato leafrole virus</i>
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>
	<i>Potexvirus</i>	<i>Hydrangea ringspot virus</i>
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i>		
<i>Potato aucuba mosaic virus</i>		
<i>Potato virus X</i> <i>White clover mosaic virus</i>		
<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>	
<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	

За прошедший с того времени период удалось идентифицировать около 50 новых вирусов растений из известных 16 семейств и 77 родов, представленных в 2005 г. в последнем докладе МКТВ. Среди них и новые для ДВ региона России, которые отнесены к 8 семействам и 18 родам (табл. 57).

С развитием методов молекулярной биологии стало возможным изучение вирусного генома, знание о котором в сочетании со стандартными тестами позволяет более точно проводить идентификацию вирусов растений и иметь более совершенную таксономию вирусов, что нами показано на примере дальневосточных изолятов ДНК-геномных ВМЦК и ВМГе. Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что молекулярные параметры часто являются более стабильными критериями для таксономии, чем фенотипические.

Накопленный нами большой экспериментальный материал позволяет утверждать, что природными резервуарами вирусов растений служат не только сами зараженные растения, но и широкий круг растений-хозяев: культивируемые овощные, декоративные, бобовые растения и картофель, а также природные травянистые растения, в т.ч. растения сорной и дикой флоры, деревья и кустарники.

Вирусы растений, являясь частью биоценозов, выполняют все соответствующие им функции. В процессе изучения связей между вирусами растений, поражающих



## Таксономический статус вирусов растений

Семейство	Род	Вирус	Критерии таксономии					
			Морфология		Передача			
			Форма вирионов	Размер, нм	Контактно-механическая	Семенинами	Вегетативно	Переносчик
<i>Caulimoviridae</i> (Каулимовирида)	<i>Caulimovirus</i> (Каулимовирусы)	мозаики цветной капусты	С	50	+	-	+	Т
		мозаики георгины	С	-	+	-	+	Т
<i>Rhabdoviridae</i> (Рабдовирида)	<i>Cytorhabdovirus</i> (Циторабдовирусы)	закукливания злаков	Пул./Б	170×65	+	-	-	Ц
		северной мозаики злаков	Пул./Б	420×67	+	-	-	Ц
<i>Bromoviridae</i> (Бромовирида)	<i>Bromovirus</i> (Бромовирусы)	мозаики коистра	С	26	+	-	-	Т, Н, К
		мозаики горошка однопарного	С	27	+	-	-	-
	<i>Alfavirus</i> (Альфамоновирусы)	мозаики люцерны	Б	58×18	+	-	-	Т
	<i>Cucumovirus</i> (Кукумовирусы)	огуречной мозаики	С	30	+	-	-	Т, К.к.
		аспермии томата	С	29	+	-	+	Т
<i>Comoviridae</i> (Комовирида)	<i>Comovirus</i> (Комовирусы)	задержки роста сои	С	28-30	+	+	-	Т
		мозаики редиса	С	28-30	+	-	+	Ж
		крапчатости красного клевера	С	30	+	-	-	Д
	<i>Nepovirus</i> (Неповирусы)	мозаики резухи	С	30	+	-	-	-
		короткоузлия винограда	С	30	+	-	+	-
		кольцевой пятнистости малины	С	30	+	-	-	-
		кольц. пятн. табака	С	28	+	+	-	-
кольц. пятн. томата	С	28	+	-	-	-		
<i>Luteoviridae</i> (Лютеовирида)	<i>Polerovirus</i> (Полеровирусы)	скручивания листьев картофеля	С	23-29	-	-	+	Т, К.к., П.к.

Семейство	Род	Вирус	Критерии таксономии					
			Морфология		Передача			
			Форма ви- рионов	Размер, нм	Контактно- механическая	Семе- нами	Вегета- тивно	Перенос- чик
	<i>Luteovirus</i> (Лютеовирусы)	желтой карликовости яч- меня	С	25	-	-	-	Т
	<i>Elatovirus</i> (Элатовирусы)	деформирующей мозаики гороха I	С	28	+	-	-	Т
<i>Potyviriidae</i> (Потивириды)	<i>Potyvirus</i> (Потивирусы)	обыкновенной мозаики фасоли	Н	740×12	+	+	-	Т
		желтой мозаики фасоли	Н	700-750×11	+	+	-	Т
		мозаики гиппеаструма	Н	720-750×11-15	+	-	-	Т
		желтой карликовости лука	Н	770×11	+	-	+	Т
		А-вирус картофеля	Н	730×11-15	+	-	+	Т
		У-вирус картофеля	Н	730×11	+	-	+	Т, П.к., К.к.
		мозаики сои	Н	650-750×15	+	+	-	Т
		мозаики клевера гибрид- ного	Н	780×12	+	-	-	Т
		гравировки табака	Н	750×11	+	-	-	Т
		Традесканции белоцвет- ковой	Н	750-780×11	+	-	-	Т
		мозаики турнепса	Н	720-780×11	+	-	+	Т
		пестролепестности тюль- панов	Н	750-760×160	+	-	-	Т
		мозаики арбуза I	Н	760-800×12	+	-	-	Т



<i>Flexiviridae</i> (Флексивирида)	<i>Potexvirus</i> (Потексвирусы)	кольцевой пятнистости гортензии	П	500×12	+	-	+	-
		мозаики подорожника азиатского	П	490-530×11		-	-	-
		аукуба мозаики картофеля	П	580×11	+	-	+	Т
		X-вируса картофеля	П	530×11	+	-	+	Г, К.к.
		мозаики белого клевера	П	480×12	+	-	-	-
	<i>Carlavirus</i> (Карлавирусы)	бессимптомности лилии	П	620-690×11	+	-	-	Т
		M-вирус картофеля	П	650×11	+	-	+	Т, К.к., П.к.
		S-вирус картофеля	П	657×12	+	-	+	Т, К.к., К.п.,
		мозаики горошка ложно- сочевичного	П	650×11	+	-	-	Т
	<i>Tombusviridae</i> (Томбусвирида)	<i>Necrovirus</i> (Некровирусы)	некроза табака	С	26-30	+		Г
«Плавающие» роды	<i>Tobamovirus</i> (Тобамовирусы)	зеленой крапчатой мозаи- ки огурца	П	300×18	+	+	-	-
		томатной мозаики	П	300×18	+	+	+	-
		табачной мозаики	П	300×18	+	+	+	-
	<i>Tobravirus</i> (Тобравирусы)	погремковости табака	П	180-197, 46-114×22	+	+	-	Н
	<i>Hordeivirus</i> (Хордеивирусы)	штриховатой мозаики ячменя	П	110-160×20	+	+	-	-
<i>Tenuivirus</i> (Тсневивирусы)	штриховатости риса	Т.н.	9-10	+/-	-	-	-	

Условные обозначения: форма вирионов: С – сферическая, П – палочковидная, Н – нитевидная, Т.н. – тонкие волокна, нити, Б – бацилловидная; переносчик: Т – тли, К – клещи, Н – нематоды, Ц – цикадки, Г – почвенные грибы, Д – долгоносики, Ж – жуки, К.к. – картофельная коровка, П.к. – полевой клоп, прочерк обозначает – не передается.

с/х культуры, и биоценозами – природными очагами вирусной инфекции – создана Ю.И. Власовым (Власов, 1974; 1992) теория природной очаговости вирусных болезней растений. Для типичных природоочаговых болезней характерно распространение вирусов растений различными видами насекомых-переносчиков (тлями, цикадками и др.) и сохранение в дикорастущих растениях многих видов. Все это создает условия для длительного сохранения вирусной инфекции в природных очагах. Примерами вирусов, вызывающих типичные природоочаговые болезни, являются ВОМ, ВАТ, ВМК, ВЖКЯ, ВЗЗ и ВСМЗ, выявленные в Дальневосточном регионе России. Другие вирусы растений, например ВЖМФ, ВОМФ, ВМЦК и др., сохранили связь с природными очагами и приобрели устойчивую циркуляцию среди культурных растений. Среди идентифицированных дальневосточных изолятов это – ВМС, ВЗКМО и некоторые (если не большинство) вирусы плодовых и ягодных культур, связь которых с природными очагами не установлена. Вероятнее всего, эволюция этих вирусов шла в направлении максимальной приспособленности к циркуляции сельскохозяйственных культур.

Среди резерваторов вирусов растений особая роль отводится сорным растениям и растениям дикой флоры. Видимые симптомы вирусной инфекции у большинства таких растений (резерваторов вирусов) нередко не проявляются. Вероятно, длительное сосуществование систем вирус–растение–хозяин приводит к установлению в природе относительного равновесия, в связи с чем вирусные болезни в природных очагах протекают нередко без проявления симптомов. На территории Дальнего Востока в природных ценозах зафиксировано более 120 вирусов подобных заболеваний на более чем 50 видах растений (Костин, 2005).

Наши собственные экспериментальные данные показали, что для многих вирусов растений характерен широкий круг растений-хозяев, и в их числе не только культурные растения. Однако если наши результаты по биологическому тестированию сравнивать с известными литературными данными, то оказывается, что многие дальневосточные изоляты вирусов растений имеют ограниченный круг поражаемых растений. Это характерно, например, для ВЖМФ, ВОМФ, которые поражают только растения семейства бобовых. Различаются они часто и по ТТИ. Так, для изолята ВТМ из ириса получена самая низкая ТТИ – 80 °С, в то время как наиболее характерная для многих штаммов ВТМ – 90–96 °С.

Степень распространения вирусов растений в природе определяется количеством резерваторов, вирулентностью изолятов вируса и наличием векторов. Из табл. 57 видно, что большинство дальневосточных изолятов вирусов растений распространяются в естественных условиях с помощью насекомых (тлей, цикадок, клещей, жуков и пр.) (рис. 129). Однако основная роль в переносе многих дальневосточных изолятов вирусов связана с различными видами тлей. Высокая эффективность передачи вирусов растений тлями объясняется высоким потенциалом их размножения, широким набором кормовых растений, особенностями питания, большой подвижностью, миграциями и циклическим чередованием растений-хозяев, обеспечивающим вирусам наиболее благоприятные условия распространения. Чаще всего дальневосточные изоляты вирусов переносятся неперсистентно. Этот путь передачи хорошо изучен фитовирусом-



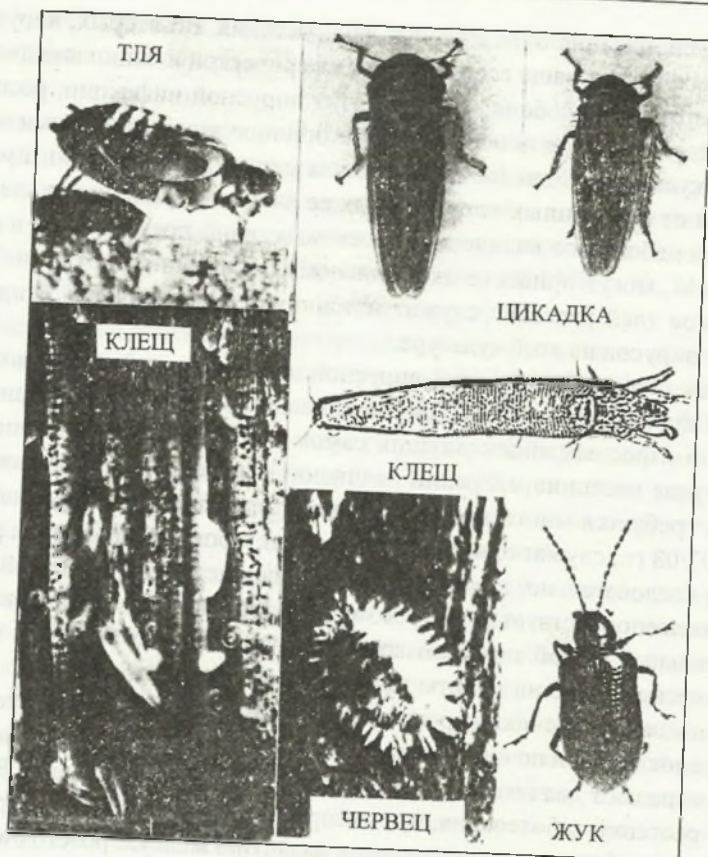


Рис. 129. Насекомые – переносчики вирусов растений  
(по: Хиббс и Харисон, 1978)

логами, и основные его моменты заключаются в отсутствии латентного периода, так как с момента приобретения вируса тлями до его передачи проходит несколько секунд, во-вторых, отсутствует видовая специфичность (один вирус может передаваться различными видами тлей). Такая передача характерна для вирусов, способных вызывать заражение при механической инокуляции соком больших растений и имеющих нитевидную или палочковидную форму вириона (табл. 57). Примерами неперсистентных вирусов могут служить многие виды рода потивирусов – АВК, УВК, ВЖМФ, ВОМФ, ВМТ, ВМА, ВГТ и др.

Среди вирусов, которые передаются персистентным путем, следует отметить ВСЛК. Это был первый вирус, для которого экспериментально было доказано размножение в тле-переносчике *M. persicae* (Stegwee, Ponsen, 1958). Примером персистентных вирусов служит и ВЖКЯ, который распространяется в природе только определенными видами тлей (см. табл. 57, семейство Лютсовирида). Таким образом, при персистентном способе передачи вирусов растений тлями наблюдается специфичность тлей, т. е.

они выбирают для питания определенный вид растения. Во-вторых, вирусы, размножающиеся в тлях, имеют чаще всего частицы сферической и бациллоподобной формы.

При рассмотрении особенностей развития вирусной инфекции, распространяемой тлями, следует учитывать первичное и вторичное заражение этими насекомыми той или иной культуры. Большое значение для первичной инфекции имеет удаленность растения от постоянных естественных ее очагов и времени появления тлей на культуре. Даже небольшое количество насекомых, рано появившихся в поле на молодых растениях, могут привести их к сильному поражению вирусами. Кроме того, инфицированное тлей растение служит источником инфекции для вторичного распространения вирусов на этой культуре.

Очень важную роль в развитии вирусной инфекции играют и условия зимовки тлей. Многие тли зимуют как в стадии яйца (на своем первичном растении-хозяине), так и в стадии взрослых яйцокладущих самок (на вторичных растениях-хозяевах). Во втором случае весенние миграции начинаются раньше, чем в первом, так как на развитие яиц требуется много времени. Сравнительно теплые зимы, например зима 2006/07 и 2007/08 гг., служат одним из главных факторов, приводящих к ранним перелетам тлей, а следовательно, и раннему заражению растений. Активный поиск тлями растений-хозяев способствует их широкому распространению. Учитывая, что тли наносят значительный ущерб агропроизводству, чаще всего для борьбы с ними используются химические средства защиты растений.

Цикадки как переносчики вирусов растений занимают второе место после тлей и по числу переносчиков, и по числу передаваемых ими вирусов. На Дальнем Востоке и Сибири они передают два циторабдовируса – ВСМЗ и ВЗЗ и на рисе – ВШР. Цикадки вызывают у растений заболевания, при которых поражаются клетки проводящей системы, в основном флоэмы, что приводит к развитию желтух, розеточности, карликовости, израстанию и т.д. (см. табл. 57, семейство Рабдовирида).

Передача четырехногими клещами отмечена для вируса мозаики редиса (см. семейство Комовирида) и для вируса мозаики костра (см. семейство Бромовирида). Клещи определенных видов передают только строго определенные вирусы. Обитают клещи главным образом на многолетниках или двулетних растениях, где зимуют.

Для дальневосточных изолятов вирусов картофеля (ВСКК, УВК, МВК, СВК) Е.Г. Лебедевой с соавт. (1982) в природе отмечены как переносчики полевой клоп и 28-пятнистая картофельная коровка. Они довольно широко распространены на юге ДВ России.

Некоторые вирусы заражают растения через почву. Носителями этих вирусов (дальневосточные изоляты ВМК, ВНТ, ХВК, ВПТ) являются грибы и нематоды (см. семейства Бромовирида, Томбусвирида, Флексивирида и «плавающий» род тобравивирусы). При передаче вирусов (ВМК и ВПТ) нематодами инфицирование происходит в течение 15–60 мин, а иногда и в течение нескольких дней питания на корнях большого растения. Вирусы сохраняются в нематоде несколько недель.

Зооспоры гриба *Synchytrium endobioticum* – возбудителя рака картофеля – могут служить переносчиками ХВК. Для инфицирования зооспор гриба требуется, чтобы



гриб прошел цикл развития в зараженном вирусом клубне картофеля. ВНТ переносится зооспорами гриба *Olpidium brassicae*.

Существенную роль в распространении вирусов в природе играет контактно-механическая передача, при которой инфекционный сок попадает в клетки здоровых растений через повреждения волосков на листьях. В естественных условиях вирусы растений могут распространяться механически, когда под действием ветра листья больных и здоровых растений соприкасаются, или при агротехнических приемах при обработке растений. К контактными вирусам относятся ВАМК и X-, M-, S-, Y-вирусы картофеля, а для ХВК это основной способ распространения.

Передача вирусов семенами характерна для многих дальневосточных изолятов вирусов, поражающих бобовые культуры, например ВЗРС, ВМС, ВОМФ, ВЖМФ, а также тобамовирусы – ВТМ и ВМТо и хордевирус – ВШМЯ. Считается, что ВШМЯ встречается во всех континентах именно благодаря широкому обмену зерном между странами.

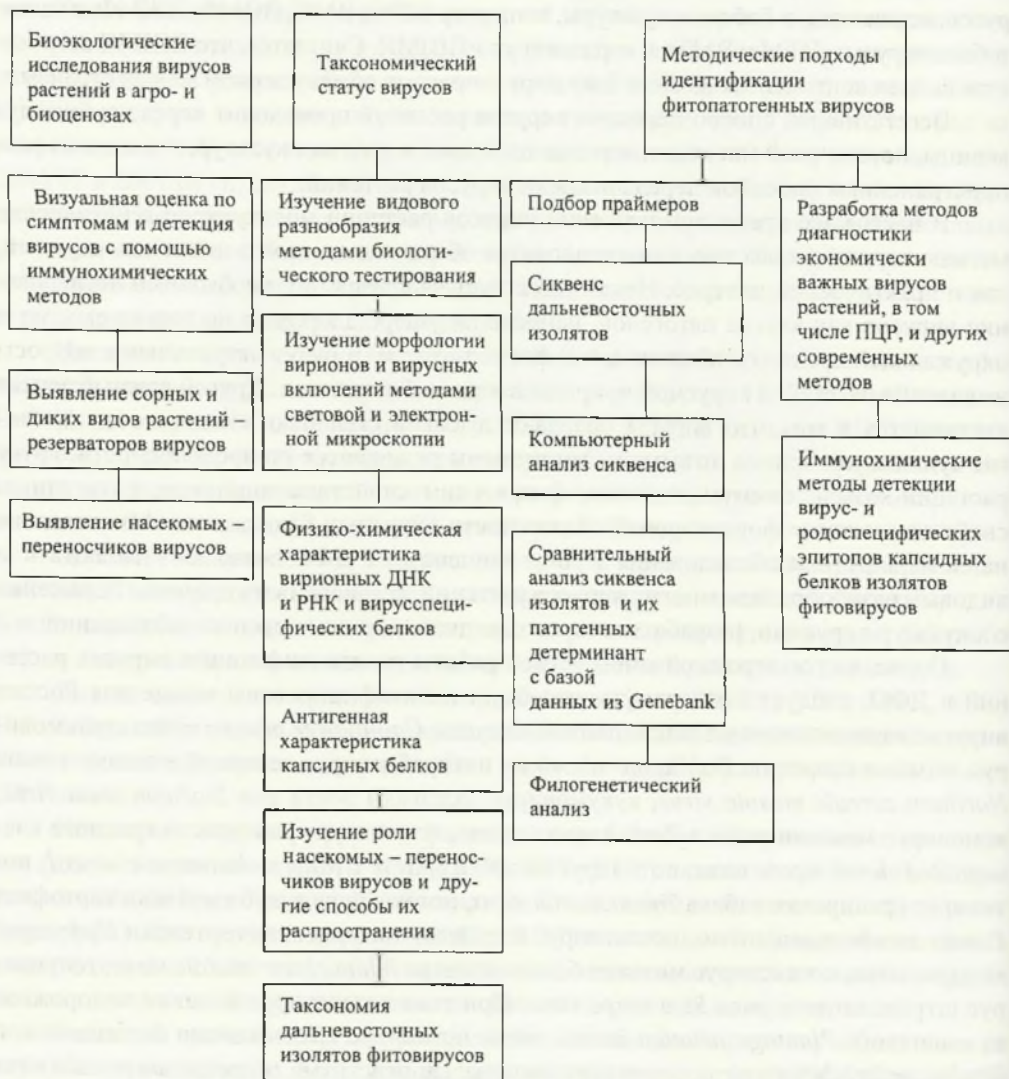
Вегетативный способ передачи вирусов растений происходит через клубни, луковицы, посадочный материал, черенки плодовых и ягодных культур, это один из распространенных способов передачи среди вирусов растений.

В настоящее время при изучении вирусов растений молекулярно-генетические методы наряду с классическими становятся обязательными, что имеет как научный, так и практический интерес. Пока существует человечество, необходимо исследование вирусов как класса патогенов, наносящих ущерб здоровью не только ему, но и окружающей среде его обитания, т.е. флоре и фауне, и будут актуальными вопросы выявления патогенов вирусной природы в агро- и биоценозах. Другой важный аспект заключается в том, что вирусы обладают высокой степенью изменчивости и многие существуют в виде штаммов. Эти штаммы отличаются по вредоносности, кругу растений-хозяев, симптоматологии, физическим свойствам вирионов, антигенным свойствам, электрофоретической подвижности вирусных белков и т.д. Многолетние наши маршрутные обследования агро- и биоценозов в ДФО позволяют наблюдать за видовым разнообразием многих вирусов растений, устанавливать причины поражения с/х культур вирусами, разрабатывать методы диагностики вирусных заболеваний.

Подводя итог огромной многолетней работы по идентификации вирусов растений в ДФО, следует подчеркнуть, что были идентифицированы новые для России вирусы: каулимовирус мозаики цветной капусты *Cauliflower mosaic virus*, каулимовирус мозаики георгины *Dahlia mosaic virus*, циторабдовирус северной мозаики злаков *Northern cereale mosaic virus*, кукумовирус задержки роста сои *Soybean stunt virus*, комовирус мозаики редиса *Radish mosaic virus*, комовирус крапчатости красного клевера *Red clover mottle virus*, потивирус мозаики арбуза 1 *Watermelon mosaic virus 1*, потивирус гравировки табака *Tobacco etch virus*, потексвирус аукуба мозаики картофеля *Potato aucuba mosaic virus*, потексвирус кольцевой пятнистости гортензии *Hydrangea ringspot virus*, потексвирус мозаики белого клевера *White clover mosaic virus*, тенуивирус штриховатости риса *Rice stripe virus*. При этом потексвирус мозаики подорожника азиатского *Plantago asiatica mosaic virus*, потивирус традесканции белоцветковой *Tradescantia albiflora virus*, потивирус мозаики гиппеаструма *Hippeastrum mosaic virus*

идентифицированы как новые виды родов потекс- и потивирусов. На бобовых растениях в природных условиях также идентифицированы новые виды – карлавирус мозаики горошка ложносочевичного *Vicia pseudorobus mosaic virus*, бромовирус мозаики горошка однопарного *Vicia unijuga mosaic virus* и потивирус мозаики клевера гибридного *Trifolium montanum mosaic virus*. Мы не приводим данные по вирусам, которые не были идентифицированы по некоторым биологическим и антигенным критериям для подтверждения их таксономического статуса. Так, были отмечены по симптомам

**Основные направления дальнейшего изучения видового разнообразия вирусов растений Дальнего Востока России**





проявления на растениях гвоздики вирус кольцевой пятнистости гвоздики *Carnation ringspot dianthovirus*, который мы обычно встречали в смешанной инфекции с вирусом крапчатости гвоздики *Carnation mottle virus*, вирус крапчатости риса и др.

Среди идентифицированных вирусов большинство РНК-геномные, но были выявлены и два ДНК-геномных, которые ранее нами не были изучены – вирусы мозаики цветной капусты и мозаики георгины. Наиболее распространены на культурных растениях вирусы рода *Potyvirus* (идентифицировано 13 видов). Самые распространенные на многих овощных и декоративных культурах – тобамовирус табачной мозаики и кукумовирус огуречной мозаики. В последние годы на многих культурных растениях широкое распространение получил потивирус желтой мозаики фасоли.

Во время идентификации дальневосточных изолятов вирусов растений показано их большое видовое разнообразие. Это тобамовирус табачной мозаики (изучено более 20 изолятов и штаммов этого вируса), каулимовирус мозаики цветной капусты (8 изолятов), потивирус желтой мозаики фасоли (более 10 изолятов поражали овощные, бобовые, декоративные растения), кукумовирус огуречной мозаики (большое разнообразие изолятов на многих растениях культурной и сорной флоры), потексвирус X-вирус картофеля и карлавирусы M- и S-вирусы картофеля (штаммы от слабых до слабопатогенных), потивирус Y-вирус картофеля (обычные и сильнопатогенные некротические штаммы), потивирус мозаики сои (от слабых до сильнопатогенных штаммов).

Надеемся, что наша попытка объединить данные по идентификации вирусов растений в ДФО России будет полезной для будущих исследований по выявлению естественных источников вирусов растений, закономерностей циркуляции вирусов растений в природе и выявлению природных очагов в биоценозах. Это представляет большой интерес не только с точки зрения познания биологии возбудителей, вызывающих заболевание растения, но и для определения таксономического статуса вирусов (вид, род, семейство) и изучения их видового разнообразия. Отсюда вытекает большая практическая значимость изучения вирусов растений для эффективной селекции устойчивых к вирусам сортов культивируемых растений и внедрение семеноводства на безвирусной основе.

## Литература

- Авдеев Ю.И., Щербинин Б.М. Поражаемость сортообразцов томатов вирусом табачной мозаики // Сб. тр. ВНИИ орошаемого овощеводства и бахчеводства. 1975. Вып. 3/4. С. 170–173.
- Алманиязов Э.А. Вирусные болезни бахчевых культур в Казахстане // Тр. ВНИИЗР. 1974. Вып. 4. С. 75–77.
- Алтухов Ю.П., Салменкова Е.А. Полиморфизм ДНК в популяционной генетике // Генетика. 2002. Т. 38, № 9. С. 1173–1195.
- Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (практическое руководство). М.: Росинформагротех, 2004. 80 с.
- Артюкова Е.В. Некоторые свойства структурных белков потексвирусов // Взаимоотношения вируса с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 25–33.
- Артюкова Е.В., Горбулев В.Г., Родионова Н.П., Крылов А.В., Атабеков И.Г. Сравнительное изучение структурных особенностей трансляции РНК потексвирусов // Молекуляр. биол. 1985. Т. 19, вып. 4. С. 1021–1028.
- Артюкова Е.В., Родионова Р.П., Крылов А.В., Атабеков И.Г. Особенности трансляции РНК вируса аукуба мозаики картофеля // Молекуляр. биол. 1987. Т. 21, вып. 2. С. 448–485.
- Артюкова Е.В., Моисеев Л.И., Толкач В.Ф., Крылов А.В. Выделение и некоторые свойства потивируса, изолированного из традесканции белоцветковой // Биол. науки. 1988. № 8. С. 30–34.
- <п>Артюкова Е.В., Крылов А.В. Вирусы группы
- Potexvirus*
- // Фитовирусол. исслед. на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. С. 30–33.
- Артюкова Е.В., Пус С.Г., Крылов А.В. Некоторые физико-химические свойства вируса желтой мозаики фасоли // Биол. науки. 1990. № 7. С. 27–32.
- Атабеков И.Г. Строение вирусов // Молекуляр. биол. вирусов. М.: Наука, 1971. С. 99–189.
- Атабеков И.Г. Молекулярная биология структурного белка фитовирусов // Иммуитет с.-х. растений к болезням и вредителям. М., 1975. С. 3–10.
- Атабеков И.Г., Попова Г.А., Каламкарлова М.В. Конформационные изменения молекул в растворах антигена вируса мозаики пшеницы // ДАН СССР. 1965. № 6. С. 1499–1502.
- Атабеков И.Г., Новиков В.К. Некоторые свойства нуклеопротеина вируса штриховатой мозаики ячменя и его структурных компонентов // Биохимия. 1966. № 31. С. 157–166.
- Ахатова Ф.К. Вирусные болезни сои в Казахстане // Вирусы и вирусные болезни растений. Киев: Наукова думка, 1974. С. 220–222.
- Балашова И.Т., Вердеревская Т.Д., Кинтя П.К. Применение стероидных гликозидов для повышения общей антивирусной устойчивости овощных культур (на примере томатов). Кишинев, 1985. 5 с.
- Баратова П.Ф., Краснова Е.Ф. Изучение штаммового состава вируса желтой мозаики фасоли // Вирусы и вирусные болезни растений. Киев: Наукова думка, 1974. С. 57.
- Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г., Краев В.Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Киев: Наукова думка, 1988. С. 373–508.
- Блоцкая Ж.В. Вирусы картофеля. Минск: Ураджай, 1989. 72 с.
- Блоцкая Ж.В. Вирусные, виroidные и фитоплазменные болезни картофеля. Минск: Тэхналогія. 2000. 119 с.
- Бобкова А.Ф., Нацвишвили Н.М., Новиков В.К., Дзантиев Б.Б., Егоров А.М., Атабеков И.Г. Диагностика У-вируса картофеля методом иммуноферментного анализа // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1985. № 1. С. 128–133.



- Богоутдинов Д.З.* Вирусные, виroidные и фитоплазменные болезни растений. Самара: Самарский ГСХА, 2000. 31 с.
- Богун Ю.В.* Сравнительная характеристика штаммов ВТМ при изучении внутриклеточных включений // Материалы Междунар. конф. студентов и аспирантов по фундамент. наукам. М.: МГУ, 2000. С. 11–12.
- Богун Ю.В.* Характеристика генетической изменчивости вируса мозаики цветной капусты (дальневосточные изоляты) и разработка методов его диагностики: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2004. 118 с.
- Богун Ю.В.* Идентификация вируса мозаики георгины молекулярно-биологическими методами // Молекуляр. биол. 2006. Т. 40, № 1. С. 184–185.
- Богун Ю.В., Гнутова Р.В.* Результаты и перспективы изучения вируса мозаики цветной капусты // Вестн. ДВО РАН. 2002. № 3. С. 118–126.
- Богун Ю.В., Гнутова Р.В.* Ультраструктура клеток растений, пораженных вирусом мозаики цветной капусты // Бюл. ГБС. 2004. Вып. 187. С. 182–185.
- Богун Ю.В., Гнутова Р.В.* Генетическая изменчивость российских дальневосточных изолятов вируса мозаики цветной капусты // Вестн. КНУ. Сер. биол. 2005. № 44. С. 10–12.
- Бойко А.Л.* Вирусы и вирусные болезни хмеля и розы эфиромасличной. Киев: Наукова думка, 1976. 71 с.
- Бородин Е.Е.* Возбудители вирусных и вирусоподобных заболеваний злаков на Дальнем Востоке: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1982. 23 с.
- Буден Ф.* Вирусы и вирусные болезни растений. М.: ИЛ, 1952. 471 с.
- Вайдман Х.Л., Шпаар Д., Блоцкая Ж.В.* Новый опасный штамм вируса Y-картофеля в Европе // Изв. Акад. аграр. наук Республики Беларусь. Минск, 1999. № 1. С. 48–51.
- Васильева Т.Я.* Изучение свойств штамма вируса табачной мозаики, выделенного из растений рода *Allium* // Биол. науки. 1976. № 1. С. 31–34.
- Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г.* Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штиинца, 1985. 311 с.
- Виллемсон С.В.* Вирусы томата и меры борьбы с ними // Картофель и овощи. 1994. № 2. С. 26–27.
- Виллемсон С.В., Толкач В.Ф.* Сравнительная характеристика двух штаммов вируса аспермии томатов различного происхождения // Фитовирусол. исслед. на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. С. 119–133.
- Виноградова Н.И., Распотова З.В.* Использование включений для диагностики вируса закукливания злаков // Тр. Омского СХИ. 1969. Т. 67. С. 144–156.
- Виноградова Н.И.* Закукливание злаков в Западной Сибири // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. М.: ВАСХНИЛ, 1978. Вып. 1. С. 44–45.
- Вишниченко В.К., Калюшин А.А., Рябов Е.В., Завриев С.К.* Клонирование полимэразной к ДНК-копии геномных РНК X вируса шалота и исследование инфекционности в протопластах сахарной свеклы // Молекуляр. биол. 2002. Т. 34. С. 167–171.
- Вишниченко В.К.* Экспрессия гена капсидного белка X вируса шалота в различных органах растений *Allium ascalonicum* // Материалы III Междунар. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». М., 2004. С. 27–29.
- Вишниченко В.К., Конарева Т.Н., Завриев С.К.* Обнаружение антигена капсидного белка вируса желтой карликовости лука-порея в проростках растительного вида *Allium* методом иммуноблоттинга // Докл. ВАСХНИЛ. 1990. № 10. С. 19–21.
- Вишниченко В.К., Стельмащук В.Я., Завриев С.К.* Исследование морфологической гетерогенности частиц X вируса шалота в условиях моноинфекции // Молекуляр. биол. 1996. Т. 30. С. 959–968.
- Вишниченко В.К., Арушанова Е.С., Келдыш М.А., Калюшин А.А., Завриев С.К.* Серологически родственный вирус шалота (ХВШ) – гибкий нитевидный вирус в растениях, не принадлежащих к роду *Allium* // Докл. РАСХН. 1999. № 2. С. 23–25.

- Власов Ю.И. Закономерности развития вирусных эпифитотий. М.: Колос, 1974. 160 с.
- Власов Ю.И. О понятии «штамм» в фитовирусологии // Штаммы вирусов растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 46(149). С. 12–14.
- Власов Ю.И. Вирусные и микоплазменные болезни растений. М.: Колос, 1992. 204 с.
- Власов Ю.И., Рядько Т.А., Лытаева Г.К. Вирусные болезни овощных культур. Л.: Колос, 1973. 73 с.
- Власов Ю.И., Тютчев С.Л., Хрущева И.В. К познанию механизма вакцинации томатов слабопатогенными штаммами ВТМ // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. М.: ВАСХНИЛ, 1978. Ч. 1. С. 133–135.
- Власов Ю.И., Теплоухова Т.Н., Артемьева Р.Р. Эпифитотиология вируса огуречной мозаики в защищенном грунте // Бюл. ВНИИЗР. 1986. № 66. С. 73–76.
- Власов Ю.И., Самсонова Л.Н. Вирусные болезни // Болезни культурных растений. СПб., 2005. С. 183–203.
- Волков Ю.Г. Идентификация и характеристика возбудителя заболевания вики однопарной *Vicia unijuga* A. Вг. в Приморском крае: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1989. 18 с.
- Волков Ю.Г., Костин В.Д. Два штамма вируса, поражающего подорожник азиатский на Дальнем Востоке // Вирусные болезни растений на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. С. 82–92.
- Волков Ю.Г., Костин В.Д. Вирус мозаики вики однопарной. II. Физико-химическая характеристика. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. 17 с. (деп. в ВИНТИ 1989. № 1167–В89).
- Волков Ю.Г., Костин В.Д., Дьяконов К.П. Вирусное заболевание клевера горного в Приморском крае // Защита растений на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. С. 7–11.
- Волков Ю.Г., Толкач В.Ф., Моисеенко Л.И., Какарека Н.М., Сибирякова И.И., Гнутова Р.В. Вирус мозаики клевера горного – новый патоген из группы *potyvirus* // Микробиол. журн. 1994. Т. 56, № 6. С. 30–35.
- Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. М.: Мир, 1978. 429 с.
- Гнутова И.В. Сравнительная характеристика штаммов ВТМ (дальневосточные изоляты), идентифицированных на овощных культурах: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 2000. 126 с.
- Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука, 1985. 183 с.
- Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. М.: Наука, 1993. 301 с.
- Гнутова Р.В. Вирусы, поражающие сельскохозяйственные растения на юге Дальнего Востока // Вестн. ДВО РАН. 2005. № 3. С. 122–130.
- Гнутова Р.В. Возбудители вирусных заболеваний овощных культур в Дальневосточном регионе // С.-х. биология. 2007. № 1. С. 56–71.
- Гнутова Р.В., Пинскер Н.И. Антисыворотка к вирусу штриховатости риса // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. С. 219–222.
- Гнутова Р.В., Чуян А.Х., Крылова Н.В., Рублева Н.В., Крылов А.В. Характеристика некоторых дальневосточных штаммов вируса табачной мозаики // Биол. науки. 1980. № 1. С. 31–37.
- Гнутова Р.В., Козловская З.Н., Чуян А.Х., Сибирякова И.И., Крылов А.В. Иммунологическая характеристика дальневосточных изолятов вируса огуречной мозаики // Взаимоотношение вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 64–71.
- Гнутова Р.В., Какарека Н.Н., Толкач В.Ф., Чуян А.Х., Сибирякова И.И., Рублева Н.Н. Некоторые свойства вируса желтой мозаики фасоли, идентифицированного на юге Дальнего Востока // Вестн. АН СССР. Сер. биол. 1989. № 3. С. 442–449.
- Гнутова Р.В., Сибирякова И.И., Радавский Ю.Л., Ярвекюльг Л.В., Зайцева П.С. Антигенная характеристика капсидных белков штаммов У-вируса картофеля // Биол. науки. 1991. № 11. С. 35–46.
- Гнутова Р.В., Какарека Н.Н., Сибирякова И.И., Харитоненков И.Г. Изучение антигенных свойств потивирусов, идентифицированных на Дальнем Востоке // Докл. ВАСХНИЛ. 1992. № 7. С. 16–20.



- Гнутова Р.В., Волков Ю.Г., Вэньцин Л. Фитовирусы Дальнего Востока России и Китая // Проблемы фитовирусол. на Дальнем Востоке. Владивосток: Дальнаука, 1996. С. 5–20.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф., Гнутова И.В. *Tobamoviruses*: новые штаммы ВТМ // Актуальные проблемы фитовирусологии и защиты растений. Минск, 1997. С. 40–41.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. Таксономический статус штамма фитовируса // Материалы конф. «Защита растений на рубеже XXI века». Минск: БелНИИЗР, 2001. С. 180–183.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. Вирусы и их штаммы, поражающие овощные культуры (дальневосточные изоляты) // Агроэкологичний журн. Киев, 2002. С.6–14.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф., Чернявская Н.М. Штаммовое разнообразие вирусов, поражающих овощные культуры семейства *Cucurbitaceae* и *Solanaceae* // Бюл. ГБС. 2003. Вып. 184. С. 189–193.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. Вирусы и их штаммы, идентифицированные на азиатской территории России // Микробиол. журн. 2004. № 66. С. 8–15.
- Гольдин М.И. Мозаика подорожника // ДАН СССР. 1948. Т. 88, № 2. С. 933–935.
- Гольдин М.И., Вострова Н.Г. Новый штамм из группы вируса мозаики табака, дающий внутриядерные включения // ДАН СССР. 1959. Т. 128, № 1. С. 183–185.
- Гольдин М.И. Вирусные включения в растительной клетке и природа вирусов. М.: АН СССР, 1963. 204 с.
- Гольдин М.И., Крылов А.В. Сравнительные данные по чувствительности индикаторного и серологического метода при определении концентрации X-вируса картофеля // Изв. СО АН СССР. 1966. Т. 4. С. 145–248.
- Горбунова Н.И., Соболева А.Б., Гумарова Х.Ф., Шевцова Л.Б. Диагностика вирусов, поражающих сою в Узбекистане // Вирусные болезни с/х растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1971. С. 143–154.
- Горбунова Н.И., Гумарова Х.Ф., Соболева А.Б., Султанов В.А., Шевцова Л.Б., Францкевич И.А. Методы получения диагностических сывороток к вирусам, поражающим сою // Вирусные болезни с/х растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1971. С. 169–176.
- Гордейчук А.И. Характеристика некоторых штаммов вируса У картофеля, распространенных в различных почвенно-климатических зонах СССР // Изв. ТСХА. 1967. № 6. С. 141–146.
- Гордейчук О.Г. Штаммы вирусов S и M картофеля и их диагностика: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток. 1972. 28 с.
- Грамм Д.П., Майор И.Ю. Построение модели белков оболочек вирусов потексгруппы // Микробиол. журн. 1990. Т. 52. № 5. С. 59–66.
- Гребенников С.Д. Псевдорозеточная болезнь (закукливание) овса в Сибири и меры борьбы с ними. М.; Л., 1941. С. 107–119.
- Дамрозе И., Копоревич В., Изнаш Я. Вирус табачной мозаики на паприке // Тр. ЛСХА. Елгава: ЛСХА, 1972. Вып. 69. С. 134–135.
- Дорохов Ю.Л. Транспорт инфекции в растении: функция, контролируемая геномом вируса и хозяина // Успехи совр. генетики. 1994. № 19. С. 3–24.
- Дрыгин Ю.Ф., Чирков С.Н., Кондакова О.А. и др. Высокочувствительные технологии молекулярной диагностики вирусных и виroidной инфекций картофеля // Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики. М.: Росинформагротех, 2007. С. 17–25.
- Дьяконов К.П., Сапоцкий М.В. О вирусах и вирусных болезнях злаковых культур в Приморском крае России // Тез. докл. III Междунар. конф. «Биоресурсы и вирусы». Киев, 2001. С. 71.
- Евдокимова С.В., Сидоров И.А. Иммуноферментный анализ в диагностике желтой карликовости ячменя // Тез. докл. семинара-совещ. «Экологизация с/х пр-ва Северокавказ. региона». М., 1995. С. 62–63.
- Ерохина Т.Н. Моноклональные антитела к вирусу желтой карликовости ячменя. Иммуноферментная тест-система для диагностики вируса // Биоорг. химия. 1995. С. 242–245.
- Жданов В.М., Львов Д.К., Еришов Ф.И. Методологические основы прогресса современной вирусологии. М.: Медицина, 1981. 211 с.

- Жулько И.Д. Вирусы – возбудители болезней винограда на юге Украины (диагностика и распространенность): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 2006. 19 с.
- Журавлев Ю.Н. Фитовирусы в целом растении и модельных системах. М.: Наука, 1979. 247 с.
- Забавина Е.С. Биологическое обоснование скрининга устойчивых форм пшеницы и тритикале к вирусным болезням в Краснодарском крае: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.; Пушкин, 1991. 19 с.
- Завриев С.К., Канюка К.В., Левай К.Э. Структура генома карлавирусов: М-вирус картофеля // Тез. докл. конф. «Достижения микробиологии в практике. Вирусы растений и микроорганизмов». Алма-Ата, 1990. С. 30.
- Завриев С.К., Канюка К.В., Левай К.Э. Полная нуклеотидная последовательность геномной РНК М-вируса картофеля // Молекуляр. биол. 1991. Т. 28. С. 761–769.
- Завриев С.К., Рязанцев Д.Ю., Кошкина Т.Е., Абрамов Д.Д. Эффективный и экономичный метод чувствительной диагностики и идентификации патогенов картофеля // Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики. М.: Росинформагротех, 2007. С. 17–25.
- Иванова Е.С., Сухов К.С. Штаммы вируса табачной мозаики, выделенные из мозаичных растений сладкого перца в теплицах Болгарии // Штаммы вирусов растений и их практическое использование. Елгава, 1981. Вып. 191. С. 53–55.
- Ивановский Д.И. Мозаичная болезнь табака // Варшавские университетские известия. 1992. Т. 5–6. С. 1–72.
- Игнаш Я.Р. Сравнительные результаты реакции тест-растений *Nicotiana sylvestris* Speng et Comes. и *Petunia hybrida* Vilm. при заражении различными изолятами вируса табачной мозаики // Тр. ЛСХА. Елгава: ЛСХА, 1978. Вып. 164. С. 21–25.
- Игнаш Я.Р., Икаунице Л.К. Заражение антигенных растений вирусом аспермии томатов в летний период // Тр. ЛСХА. Елгава: ЛСХА, 1976. Вып. 100. С. 21–25.
- Икаунице Л.К. Очистка и серология вируса некроза табака // Тр. ЛСХА. Елгава: ЛСХА, 1976. Вып. 100. С. 39–42.
- Иноуэ Т. Сравнение патогенности группы PVY, поражающих бобовые культуры Японии, и способы идентификации вирусов при помощи растений-индикаторов: пер. с яп. // Исследование штаммов вирусов растений. 1969. С. 11–29.
- Иорданова Н.Д. Диагностика вируса мозаики лука в посадочном материале // Тр. II Всесоюз. совещ. «Вирусные болезни овощных культур». Ереван: Айстан, 1976. С. 86–88.
- Иорданова Н.Д. Новое заболевание огурцов – «кольцевая пятнистость» // Бюл. ВНИИЗР. 1979. № 45. С. 77–80.
- Кайман М.Я. Изучение вирусов, вызывающих мозаики фасоли в МССР // Вирусные заболевания культурных растений. Кишинев, 1984. С. 92–96.
- Какарека Н.Н. Сравнительная антигенная характеристика капсидных белков потивирусов (дальневосточные изоляты) и их иммунодиагностика: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1995. 18 с.
- Калошин А.А., Крутов А.А., Вишинченко В.К., Завриев С.К. Аминокислотные последовательности белков, кодируемые 3'-концевыми областями геномов двух морфологических классов вирионов X-вируса шалота // Молекуляр. биол. 1998. Т. 32. С. 1091–1094.
- Кастальева Т.Б., Можяева К.А. Оптимизация методики определения вируса желтой карликовости ячменя с помощью иммуноферментного анализа // С.-х. биология. 2002. № 3. С. 49–52.
- Келдыш М.А., Помазков Ю.И. Вирусы, вириды и микоплазмы растений: учеб. пособие. М.: Изд-во РУДН, 2003. 155 с.
- Кинтя П.К., Лазурьевский Г.А., Балашова Н.Н. и др. Строение и биологическая активность структурных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Кишинев, 1987. С. 35–47.
- Кваснюк Н.Я., Гуревич Б.И., Можяева К.А. и др. (составители). Интегрированная система защиты картофеля от фитофтороза, грибных, вирусных и бактериальных болезней (Практическое руководство). М.: Росинформагротех, 2006. 72 с.



- Ковган А.А., Жданов В.М. Структура и функция генома вируса мозаики цветной капусты и его использование в генной инженерии // *Вопр. вирус.* 1989. № 5. С. 523–533.
- Козар Ф.Е., Сиверс Н.А., Щербина Н.В., Погорилько Н.А. Некоторые свойства штаммов У-вируса картофеля // *Штаммы вирусов растений.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 46 (149). С. 161–166.
- Козмицкий Ю.Н. Вирусные растения промышленных цветочных культур. М.: Колос, 1975. 80 с.
- Комидзу Ю., Иидзуки Н. Изучение вирусных болезней сои в Японии: пер. с яп. // *Бюл. Тохоку с/х станции.* 1963. № 27. С. 1–103.
- Косаковская О.И. Серологический метод изучения неовирусов плодовых культур и винограда: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Самохваловичи, 1981. 21 с.
- Коротеева А.В., Полищук В.П. Вирусы орхидных природной флоры Украины // *Микробиол. журн.* Киев, 2004. Т. 66, № 2. С. 74–80.
- Костин В.Д. Скручивание листьев картофеля, вызываемое вирусом L, и методы диагностики: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1966. 16 с.
- Костин В.Д. Вирусы дикорастущих растений Дальнего Востока России. Владивосток: Дальнаука, 2005. 123 с.
- Костин В.Д., Волков Ю.Г. Некоторые свойства вируса, поражающего подорожник азиатский // *Вирусные болезни растений Дальнего Востока.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. С. 196–204.
- Костин В.Д., Минская Л.А., Гнутова Р.В., Волков Ю.Г. Антигенные свойства вируса, поражающего подорожник азиатский // *Вирусные болезни растений Дальнего Востока.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. С. 110–115.
- Коцарь Т.Ф., Мамаев П.Ю. Обнаружение вирусов мозаики и закуклывания злаков в переносчике цикадке *Laodelphax striatellus* Fall. // *Проблемы фитовирусологии на Дальнем Востоке.* Владивосток: Дальнаука, 1996. С. 27–32.
- Краев В.Г. Современная классификация и номенклатура вирусов растений (По материалам Международного комитета по таксономии вирусов). Ч. 1 // *Микробиол. журн.* 2000. Т. 62, № 5. С. 45–71.
- Краев В.Г. Современная классификация и номенклатура вирусов растений (По материалам Междунар. комитета по таксономии вирусов). Ч. 2 // *Микробиол. журн.* 2001. Т. 63, № 2. С. 20–65.
- Краев В.Г., Порембская Н.Б., Семерникова Л.И. и др. Изучение свойств двух штаммов карликовости арахиса, выявленного на Украине // *Штаммы вирусов растений.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 46(149). С. 219–227.
- Крылов А.В. Вирусы растений Дальнего Востока. II. Кукумовирусы // *Влияние вирусов на обмен растений.* Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1983. С. 45–48.
- Крылов А.В. Вирусы растений Дальнего Востока. М.: Наука, 1992. 110 с.
- Крылов А.В., Чуян А.Х., Гнутова Р.В., Крылова Н.В., Степаненко В.И. Штаммы вируса табачной мозаики на Дальнем Востоке // *Plant Virology: Proc. 7-th conf. Czecho-Sl. plant virologist.* Prague, 1980. P. 175–186.
- Крылов А.В., Бородина Е.Е., Федотина В.Л., Минская Л.А. Рабдовирусы, поражающие злаки на Дальнем Востоке // *Plant Virology: Proc. 9-th conf. Czecho-Sl. plant virologist.* Brno, 1981. P.85–88.
- Крылов А.В., Малевич В.М., Сапоцкий М.В., Гнутова Р.В., Рублева Н.В. Вирус мозаики редиса – новый для СССР комовирус // *Биол. науки.* 1981. № 3. С. 24–30.
- Крылов А.В., Ларина Э.И., Артюкова Е.В. Кадастр вирусов растений СССР. Препр. БПИ ДВО АН СССР. Владивосток, 1987. 48 с.
- Кэрцингер В., Шпаар Д. Опыт борьбы с тлями – переносчиками вирусов в картофелеводстве в Германии // *Минск: Ахова росл.,* 2000. № 4. С. 14–16.
- Ларина Э.И. Вирус табачной мозаики на картофеле // *Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними.* Л., 1978. С. 35–36.
- Лебедева Е.Г. Картофельная коровка – переносчик вирусов картофеля // *Вирусные болезни с/х культур Дальнего Востока.* 1969. Вып. 1. С. 29–52.

- Лебедева Е.Г., Пинскер Н.И.* Полевой клоп *Lygus pratensis* – переносчик фитопатогенных вирусов картофеля в Приморском крае // Вирусные исследования на Дальнем Востоке. 1969. С. 173–177.
- Лебедева Е.Г., Дьяконов К.П., Немилостива Н.И.* Насекомые – переносчики вирусов растений на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВ кн. изд-во, 1982. 196 с.
- Леднева Р.К.* Вирус табачной мозаики, нуклеиново-белковые взаимодействия // Итоги науки и техники. Сер. молекуляр. биол. Т. 17. М.: ВИНТИ, 1982. С. 66–138.
- Лурия С., Дарнелл Дж.* Общая вирусология. М.: Мир, 1970. 423 с.
- Лурия С., Дарнелл Дж., Балтимор Д., Кэмпбэлл Э. (ред.)* Общая вирусология. М.: Мир, 1981. 677 с.
- Мазьярд Х.М.* О степени передачи вирусных заболеваний вигны через семена // Бюл. ВИЗР. 1971. № 20. С. 39–41.
- Макутенайте-Навалинскаене М.К.* Вирусные и микоплазменные болезни цветочных растений // Вильнюс: Меклас, 1981. 72 с.
- Малиновский В.И.* Механизмы устойчивости сверхчувствительных растений табака к вирусу табачной мозаики: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Владивосток, 1998. 45 с.
- Мамаев П.Ю.* Биология вирусов (северной) мозаики и закукливания злаков, их переносчика – темной пикадки *Laodelphax striatellus* F: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1998. 117 с.
- Мамаев П.Ю.* Взаимоотношения вируса мозаики злаков с темной пикадкой (*Laodelphax striatellus* Fall.) // Фитовирусол. исслед. на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1989. С. 164–171.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- Метьюз Р.* Вирусы растений. М.: Мир, 1973. 600 с.
- Милюк Б.Н.* Вирусные и микоплазменные заболевания винограда на Украине (диагностика, патогенез, меры борьбы): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Л., 1982. 33 с.
- Милюк Б.Н., Штеренберг П.М., Березовская Е.А.* Штаммы вируса короткоузлиа на виноградниках Украины // Штаммы вирусов растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 46(149). С. 245–248.
- Минская Л.А., Новиков В.К., Костин В.Д.* Физико-химические свойства вируса, поражающего подорожник азиатский на Дальнем Востоке // Вирусы и вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. С. 61–69.
- Минская Л.А.* Физико-химические свойства вируса, поражающего подорожник азиатский на Дальнем Востоке: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1980. 16 с.
- Минская Л.А., Калашникова Л.В., Алексеева Т.И., Крылов А.В.* К вопросу об идентификации растворимых антигенов вирусов мозаики и закукливания злаков // Взаимодействия вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 40–49.
- Минская Л.А., Федотина В.Л., Бородина Е.Е., Крылов А.В.* Рабдовирусы злаков СССР М.: Наука, 1987. 128 с.
- Можяева К.А.* Вирусные болезни злаков в России и Украине: обзор литературы за 1990–2001 гг. / РАСХН. ЦНСХБ. Всерос. НИИ фитопатологии. М., 2003. 36 с.
- Можяева К.А., Васильева Т.А.* Новый вирус на луке // С.-х. биология. 1973. Т. 8, № 3. С. 461–463.
- Можяева К.А., Кастальева Т.Б.* Вирус желтой карликовости ячменя и его штаммы в России // Тез. докл. III Междунар. конф. «Биоресурсы и вирус». Киев, 2001. С. 89.
- Можяева К.А., Кастальева Т.Б.* Вирус желтой карликовости ячменя и его штаммы в России // Агроекологичний журн. Спец. выпуск. 2002. С. 28–33.
- Можяева К.А., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В.* Испытание сортов и линий овса на толерантность к вирусу желтой карликовости ячменя // Тез. докл. V Междунар. конф. «Биоресурсы и вирус». Киев, 2007. С. 184.



- Можжаева К.А., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В.* Вирус желтой карликовости ячменя и другие вирусы зерновых культур на территории Российской Федерации. М.: Росинформагротех, 2007 а. 32 с.
- Можжаева К.А., Кастальева Т.Б., Лоскутова И.Г.* О толерантности растений овса к вирусу желтой карликовости ячменя // С.-х. биология. 2007 б. № 3. С. 63–73.
- Моисеенко Л.И., Какарека Н.Н., Сибирякова И.И., Гнутова Р.В.* Некоторые физико-химические свойства вируса мозаики турнепса (дальневосточный изолят) // Докл. ВАСХНИЛ. 1991. № 11. С. 44–48.
- Молдован М.Я.* Вирусные болезни табака и меры борьбы с ними. Кишинев: Штиинца, 1979. 226 с.
- Морозов С.Ю., Захарьев В.И., Чернов Б.К.* и др. Анализ первичной структуры и локализации гена белка оболочки в геномной РНК X-вируса картофеля // ДАН СССР. 1983. Т. 271, № 1. С. 211–215.
- Мураивкинский К.Е.* Новые болезни культурных злаков в Западной Сибири // Тр. Омского СХИ. 1935. Т. 1, вып. 6. С. 3–30.
- Навалинскене-Макутенайте М.К.* Вирусные и микоплазменные болезни цветочных растений. Вильнюс: Моклас, 1981. 70 с.
- Навалинскене М.* Вирусы цветочных культур (идентификация, биология и профилактика заболеваний): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Вильнюс. 1994. 83 с.
- Навалинскене М., Самуйтене М.* Вирусные болезни цветочных растений. 13. Идентификация вирусов, поражающих петунии // Вильнюс: Biologija, 1999. № 4. С. 62–69.
- Немилюстева Н.И.* Штриховатость риса в Приморском крае: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1978. 24 с.
- Немилюстева Н.И., Соколова Е.Е.* Цикадка *Laodelphax striatellus* Fall (Delphacidae) – переносчик вируса заукливания злаков в Амурской области // Фауна и биология насекомых Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1977. С. 126–128.
- Николаева О.В., Новиков В.К., Каргаманов В.Н., Бобкова А.Ф., Атабеков И.Г.* Определение М- и S-вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа // С.-х. биология. 1985. № 2. С. 96–102.
- Николенко М.П., Омельченко Л.И.* Особенности эпифитотий вируса желтой карликовости и возможности предупреждения потерь урожая озимой пшеницы, ячменя и тритикале: обзор // С.-х. биология. 1985. № 8. С. 63–68.
- Новиков В.К., Атабеков И.Г., Азур М.С., Ярвекюльс Л.В., Нурмисте Б.Х.* Метод получения препарата Y-вируса картофеля и приготовления диагностических антисывороток // С.-х. биология. 1982. Т. 17, № 5. С. 706–711.
- Новиков В.К., Николаева О.В., Варицев Ю.А., Гатаулина И.А., Драмлян А.Х.* Выделение очищенных препаратов вирусов картофеля для приготовления диагностических антивирусных сывороток // Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ. «Теория и практика использования иммунитета с/х культур к вирусным болезням». Вильнюс, 1984. С. 250–251.
- Одинцова Т.И., Андреева Е.Н., Пахальский В.А., Мусолямов Ф.Х., Егоров К.А.* Структурный анализ капсидных белков ВЗКМО // Биохимия. 2000. № 65. С. 672–679.
- Оржеховская Т.Е.* Особенности селекции и семеноводства лука шалота и чеснока с вирусной инфекцией: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск, 1987. 16 с.
- Орхидеи: выращивание и уход. М.: Аст: Минск: Харвест, 2002. 112 с.
- Пинскер Н.И.* Фауна цикадовых рисового поля в Приморском крае // Энтомофауна советского Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1973. С. 135–139.
- Пинкевич Е.В., Крылов А.В.* Выделение и некоторые физико-химические свойства вируса мозаики сои // Биол. науки. 1977. № 11. С. 26–31.
- Пирузян Э.С.* Основы генетической инженерии растений. М.: Наука, 1988. 304 с.
- Поливанова Т.А.* Вирус желтой мозаики фасоли в Приморском крае // Материалы IX конф. молодых ученых Дальнего Востока «Некоторые вопросы биологии и медицины на Дальнем Востоке». Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1968. С. 21–24.

- Поливанова Т.А.* Вирусные болезни сои на Дальнем Востоке // Вирусол. исслед. на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1969. С. 188–190.
- Поливанова Т.А.* Вирусные болезни сои // Болезни и вредители сои на юге Дальнего Востока и меры борьбы с ними. Владивосток, 1971. С. 104–144.
- Поливанова Т.А.* Мозаичное заболевание сои, вызываемое вирусом задержки роста сои // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1974. С. 52–54.
- Поливанова Т.А.* Вирусы, поражающие клевера в Приморском крае. 1. Вирусы мозаики гороха и желтой мозаики фасоли // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1975. Т. 16. С. 12–20.
- Поливанова Т.А.* Возбудители вирусных болезней сои // Возбудители болезней с/х культур на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. С. 51–58.
- Поливанова Т.А., ГнUTOва Р.В., Зайцева Н.М.* Серодиагностика вируса задержки роста сои // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1976. С. 211–218.
- Поливанова Т.А., Слепухина Л.П., Степаненко В.И.* Вирусы, поражающие клевера в Приморском крае // Вирусы и вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 48(15). С. 75–83.
- Поливанова Т.А., Слепухина Л.П., Степаненко В.И.* Вирусы, поражающие клевера в Приморском крае. Сообщение III. Получение антисывороток к вирусу мозаики белого клевера // Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. С. 111–115.
- Поливанова Т.А., Жук Т.П.* Штаммы вируса желтой мозаики фасоли в южной зоне Нечерноземья // Тез. докл. II Междунар. симпозиум «Штаммы вирусов растений и их практическое использование». Елгава, 1981. С. 120–121.
- Поливанова Т.А., Слепухина Л.П., Лазарева Л.В., Степаненко В.И.* Штамм вируса огуречной мозаики, выявленный из кормовых бобов в Приморье // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. Вып. 11. С. 75–82.
- ✓ *Поливанова Т.А., Крылов А.В.* Вирусы, идентифицированные на зернобобовых культурах на Дальнем Востоке // Взаимоотношения вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 87–93.
- Поликсенова В.Д.* Повышение устойчивости томатов к вирусным болезням // Материалы Междунар. конф. «Актуальные вопросы фитовирусологии и защиты растений». Минск, 1997. С. 38–39.
- Попова Г.А.* Изучение антигенов вируса мозаики озимой пшеницы и его взаимосвязи с вирусом: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1968. 24 с.
- Попова Г.А., Атабеков И.Г.* Изучение физико-химических свойств антигенов вируса мозаики озимой пшеницы и вируса закукливания злаков // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. Киев: Наукова думка, 1966. С. 342–348.
- Проценко А.Е.* Морфология и классификация фитопатогенных вирусов. М.: Наука, 1966. 187 с.
- Проценко А.Е.* Вирусные болезни некоторых растений дальневосточной флоры // Вирусол. исследования на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВФ СО АН СССР, 1969. С. 190–192.
- Проценко А.Е.* Штаммы или виды вирусов рода *Virothrix Ryzk* // Штаммы вирусов. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. С. 5–11.
- Путнаэрле А.* Некоторые свойства вируса некроза табака – возбудителя болезни «Augusta» тютюпанов // Тр. ЛСХА. 1976. Вып. 100. С. 32–38.
- Развязкина Г.М.* Вирусные заболевания злаков. Новосибирск: Наука. СО АН СССР, 1975. 291 с.
- ✓ *Развязкина Г.Т., Полякова Г. П., Штейн-Марголина В.А.* Упрощенный метод обнаружения вирусных частиц из сока больных растений // Вопр. вирусологии. 1968. № 5. С. 633–635.
- Рейфман В.Г.* Семеноводство картофеля на безвирусной основе (опыт совхоза «Урожайный» Приморского края) // Пути повышения продуктивности растениеводства на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1981. С. 71–93.



- Рейфман В.Г., Крылов А.В., Степаненко В.И., Костин В.Д. Возбудители вирусных болезней картофеля на Дальнем Востоке // Вирусные болезни с/х растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1971. С. 31–39.
- Рейфман В.Г., Поливанова Т.А. Крылов А.В., Костин В.Д., Степаненко В.И. Вирусные болезни растений и их возбудители на Дальнем Востоке // С.-х. биология. 1973. Т. 8, № 4. С. 560–563.
- Рейфман В.Г., Пинскер Н.И. Штриховатость – вирусное заболевание риса в Приморье // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1973. Т. 31(134). С. 5–11.
- Рейфман В.Г., Руцкова В.Р. Новые заболевания картофеля на юге Дальнего Востока // Тез. докл. Всесоюз. совещ. «Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними». М.; Л.: ВАСХНИЛ, 1978. С. 100–101.
- Рейфман В.Г., Гнутова Р.В., Романова С.А. Физико-биологические свойства вирусов, поражающих картофель, и меры оздоровления семенного материала на Дальнем Востоке // С.-х. биология. 1996. № 3. С. 93–106.
- Реунов А.В. Цитопатология пораженной вирусами (ВТМ, ХВК) растительной клетки и проблема устойчивости растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев, 1989. 36 с.
- ✓ Реунов А.В. Вирусный патогенез и защитные механизмы растений. Владивосток: Дальнаука, 1999. 173 с.
- Романова С.А. Итоги изучения вирусных, вириодных и микоплазменных болезней картофеля на Дальнем Востоке // Стабилизация и развитие фитовирусологии на Дальнем Востоке России. Владивосток: Дальнаука, 2002. С. 175–192.
- Романова С.А., Гнутова Р.В., Андреева В.А., Мартынова Р.В., Рейфман В.Г. Два штамма ХВК, выделенные в Приморье // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. М.: ВАСХНИЛ, 1978. С. 89–90.
- Романова С.А., Рейфман В.Г. Штаммовый состав Х-вируса картофеля в Приморском крае // Материалы II конф. «Штаммы вирусов растений и их практическое использование». Елгава, 1981. С. 130–133.
- Романова С.А., Леднева В.А. Вирус табачной мозаики на картофеле в Приморском крае // Фитовирусол. исслед. на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО РАН, 1989. С. 191–193.
- Романова С.А., Гнутова Р.В. Биологические свойства штамма вируса огуречной мозаики, выделенного из картофеля на Дальнем Востоке России // Тез. III Междунар. конф. «Биоресурсы и вирусы». Киев, 1998. С. 111.
- Романова С.А., Леднева В.А., Гнутова Р.В. Биологические свойства штамма вируса огуречной мозаики, выявленного на картофеле на Дальнем Востоке // Докл. РАСХН. 2000. № 5. С. 16–18.
- Рублева Н.В., Гнутова Р.В. Иммунная электронная микроскопия вирусов группы *Potexvirus* // Взаимоотношение вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1985. С. 110–112.
- ✓ Рупасов В.В., Морозов С.Ю., Канока К.В., Журина В.Ю., Лукашева Л.И., Завриев С.К. Нуклеотидная последовательность и структурная организация 3'-концевой области геномной РНК М-вируса картофеля // Молекуляр. биол. 1990. Т. 24. С. 448–459.
- Рыжков В.Д. Систематика вирусов в современной литературе // Микробиол. 1952. Т. 21, вып. 4. С. 458–476.
- Рыжков В.Д., Проценко А.Е. Атлас вирусных болезней растений. М.: Наука, 1968. 135 с.
- Рыжков В.Д. Фитопатогенные вирусы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1946. 227 с.
- Сапоцкий М.В. Выделение F-вируса картофеля и некоторые свойства его структурного белка // Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. С. 50–58.
- Сапоцкий М.В. Дальневосточный изолят вируса мозаики редиса. Идентификация и структура генома: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 1990. 23 с.
- Сапоцкий М.В., Дрыгин Ю.Ф. Характеристика РНК вируса мозаики редиса. Концевые структуры и продукты трансляции // Биохимия. 1990. Т. 55, вып. 8. С. 1437–1444.

Сапоцкий М.В., Моисеенко Л.И., Какарека Н.Н., Мамаев П.Ю., Гнутова Р.В. Особенности выделения и антигенные свойства белка «растворимого» антигена вируса мозаики злаков // Докл. ВАСХНИЛ. 1992. № 2. С. 6–11.

Сердеченко В.Д. Штамм вируса табачной мозаики, вызывающий кольцевые пятнистости листьев табака в Молдавии: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1974. 23 с.

Сибирякова И.И., Гнутова Р.В., Толкач В.Ф., Рублева Н.В., Чуян А.Х., Крылов А.В. Биологические свойства местного изолята некроза табака и получение специфических сывороток // С.-х. биология. 1987. № 5. С. 55–60.

Сибирякова И.И., Курика А.В., Гнутова Р.В., Павленко А.Ф., Оводов А.В., Крылов А.В. Исследование иммуноферментными методами антигенного родства вирусов кольцевой пятнистости гортензии, мозаики белого клевера, X-вируса картофеля и аукуба мозаики картофеля // Биол. науки. 1987а. № 2. С. 20–28.

✓ Сибирякова И.И. Повышение активности антисывороток к вирусам растений, применяемых в иммунохимических реакциях: дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1987. 141 с.

Смит К. Вирусные болезни растений. М.: ИЛ, 1960. 482 с.

Смит К. Некроз табака // Вирусные болезни растений. М.: Мир, 1960. С. 436–437.

Созонов А.Н. Вирус Y картофеля в Северо-Западном регионе РФ: распространение, штаммовый состав и профилактика вызываемых им заболеваний: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2005. 19 с.

Соколова Е.Е., Ларина Э.И., Степаненко В.И., Крылов А.В. Вирус мозаики костра на Дальнем Востоке // Вирусы и вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. Т. 48(151), вып. 8. С. 53–60.

Соколова Е.Е. Вирусные и вирусоподобные поражения злаков Дальнего Востока // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. М.: ВАСХНИЛ, 1978. С. 41–43.

Станюлис Ю.П. Вирусные болезни бобовых культур в Литве // Вирусы и вирусные болезни растений. Киев: Наукова думка, 1974. С. 210–213.

Станюлис Ю.П., Макутенайте М.К., Зитикайте И.С. Некоторые свойства изолятов вируса огуречной мозаики (ВОМ), выделенных из бобовых и декоративных растений в Литве // Штаммы вирусов растений. Владивосток, 1977. С. 198–203.

Станюлис Ю.П., Генис Я.П., Зитикайте И.С. Вирусные и микоплазменные болезни клеверов в Литве // Plant Virology: Proc. 8-th conf. Czecho-Sl. plant virologist. Bratislava, 1980. P. 313–318.

Сухов К.С. Белковые внутриклеточные включения при закукливании злаков // Микробиология. 1940. Т. 9, № 2. С. 188–196.

Сухов К.С. Закукливание злаков // Селекция и семеноводство. 1940. № 11/12. С. 30–33.

Сухов К.С. Доказательство инфекционности очищенного белкового препарата вируса мозаики (закукливания) овса // ДАН СССР, 1943. Т. 40. С. 190–192.

Сухов К.С., Вовк А.М. Мозаичная болезнь овса (закукливание овса) // ДАН СССР. 1938. Т. 19, № 3. С. 207–210.

Сухов К.С., Вовк А.М. Закукливание культурных злаков и пути его распространения в природе // М.; Л.: АН СССР, 1940. 45 с.

Сухов К.С. Вирусы. М.: Наука, 1956. 370 с.

Сухов К.С., Вовк А.М., Алексеева Т.С. Получение очищенного белкового препарата вируса мозаики злаков (закукливание овса) // ДАН СССР. 1943. Т. 41, № 8. С. 358–360.

Сухов К.С., Сухова М.Н. Взаимоотношения между вирусом закукливания и переносчиком *Laodelphax striatellus* Fallen // ДАН СССР. 1943. Т. 26, № 5. С. 485–488.

Такахаси К., Танака Т., Иида В. Штаммы вирусов мозаики сои и задержки роста, выделенные в районе Тохоку // Кита Нихон Бегайси кэнко кампо: пер. с яп. 1963. № 15. С. 42–44.

Такахаси К., Танака Т., Иида В. Изучение вирусов сои и их штаммов в Японии // Вирусные болезни с/х растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1969. Вып. 1. С. 119–138.

✓ Тальянский М.Э. Молекулярно-биологические основы взаимодействия между вирусами растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1984. 35 с.



- Теплоухова Т.Н., Малевич В.М., Рублева Н.В., Степаненко В.И., Гнутова Р.В., Крылов А.В. Вирусные болезни овощных культур в Приморском крае // Пути повышения продуктивности растениеводства, кормопроизводства и садоводства на Дальнем Востоке. Владивосток, 1987. С. 183–187.
- Тельпуховская А.Г. Цветы нашего сада. Иркутск: Вост.-Сиб. кн. изд-во, 1991. 386 с.
- Тимошенко Н.А., Александрова Н.М., Конарева Т.Н., Аршава Р.В., Завриев С.К. Диагностика растений, зараженных потивирусами, с помощью антител против вирусспецифических цитоплазматических включений // Докл. ВАСХНИЛ. 1989. № 7. С. 15–19.
- Толкач В.Ф. Вирус мозаики гиппеаструма на Дальнем Востоке // Plant Virology: Proc. 10-th conf. Czecho-Sl. plant virologist. Prague, 1989. P. 82.
- Толкач В.Ф. Идентификация и биологическая характеристика поти- и тобамовирусов (дальневосточные изоляты): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1995. 24 с.
- Толкач В.Ф., Чуян А.Х., Шафрановская И.В. и др. Биологическая характеристика ВТМ, изолированного из ириса в Приморском крае // Бюл. ГБС. 1988. Вып. 157. С. 72–76.
- Толкач В.Ф., Чуян А.Х., Крылов А.В. Характеристика вируса из группы потивирусов, выделенной из Tradescantia белоцветковой *Tradescantia albiflora* Kunth. на юге Дальнего Востока // Бюл. ГБС. 1989. Вып. 157. С. 68–72.
- Толкач В.Ф., Чуян А.Х., Крылов А.В. Биологическая характеристика вируса мозаики турнепса, обнаруженного на лобе «Октябрьская» на юге Приморского края // Проблемы фитовирусологии на Дальнем Востоке. Владивосток: ДВО АН СССР, 1991. С. 43–47.
- Толкач В.Ф., Волков Ю.Г., Гнутова Р.В. Характеристика дальневосточного изолята вируса табачной мозаики, обнаруженного на перце // Докл. ВАСХНИЛ. 1992. № 1. С. 30–35.
- Толкач В.Ф., Коротаева С.Г., Волков Ю.Г., Кикарека Н.Н., Гнутова Р.В. Некоторые характеристики карлавируса, вызывающего некротическую мозаику вики ложночиновой (*Vicia pseudorobus* Fisch. et Mey) в Хабаровском крае // Фитовирусы Дальнего Востока. Владивосток: ДВО РАН, 1993. С. 96–103.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Сравнительная биологическая характеристика вируса обыкновенной мозаики фасоли, выявленного на юге Дальнего Востока России и КНР // Докл. РАСХН. 1998. № 5. С. 18–19.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Новый штамм ВЖМФ, выявленный в Приморском крае на фасоли // Докл. РАСХН. 1999. № 4. С. 10–12.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Возбудители вирусных заболеваний овощных культур на юге Дальнего Востока. // Тез. III Междунар. конф. «Биоресурсы и вирусы». Киев, 2001. С. 102.
- Толкач В.Ф., Чернявская Н.М., Гнутова Р.В. Вирус мозаики арбуза – новый для дальневосточного региона патоген, поражающий тыква // Вестн. защиты растений. СПб., 2001. № 3. С. 40–45.
- Толкач В.Ф., Богоунов Ю.В., Гнутова Р.В. Вирус мозаики цветной капусты в Приморском крае // Вестн. защиты растений. СПб., 2002. № 1. С. 51–58.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Вирусы, поражающие овощные культуры на юге Дальнего Востока России // Докл. РАСХН. 2003. № 2. С. 16–19.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Вирус огуречной мозаики на декоративных культурах (российские дальневосточные изоляты) // Тез. V Междунар. конф. «Биоресурсы и вирусы». Киев, 2007. С. 102.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Обнаружение на овощных культурах семейства *Brassicaceae* каулимовируса мозаики цветной капусты и выявление вирусоустойчивых сортов // Изв. ТСХА. 2008. Вып. 4. С. 93–101.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Вирус огуречной мозаики, обнаруженный на овощных культурах в Хабаровском крае // Сиб. вестн. с/х науки. 2008. № 10. С. 29–37.
- Толмачева И.А., Анненков Б.Г. Фитопатогенные вирусы на картофеле в Приамурье и защита новых сортов от вирусного поражения // Теорет. и прикл. аспекты растениеводства на Дальнем Востоке. Хабаровск, 2003. С. 102–111.

- Тулегенов Т. Надежность растительных организмов при потивирусной инфекции. Алма-Ата, 1989. 144 с.
- Тулегенов Т.А., Ахатова Ф.К., Рахимбердиев Ф. Потивирусы, поражающие сельскохозяйственные культуры Казахской ССР // Тез. Всесоюз. конф. «Пути совершенствования микробиол. борьбы с вредными насекомыми и болезнями растений». Велегож-Оболенск, 1986. С. 171–172.
- Федотина В.Л. Закукливание злаков – смешанная инфекция // ДАН СССР. 1974. Т. 128, № 5. С. 1211–1213.
- Федотина В.К., Атабеков И.Г. Abortивная инфекция вируса мозаики озимой пшеницы в процессе (*Rapiscum miliaceum*) // Тез. докл. XII Всесоюз. конф. по электронной микроскопии. М., 1980. С. 247–249.
- Фолимонова С.Ю., Фолимонов А.С., Аграновский А.А., Атабеков И.Г. Идентификация штамма У-вируса картофеля, вызывающего кольцевой некроз клубней (УВК-NTN), с помощью иммуноспецифической полимеразной цепной реакции (ИС-ПЦР) // Доклады РАСХН. 1998. № 5. С. 16–18.
- Хессайон Д.Г. Все о комнатных растениях. М.: Кладезь-Букс, 2004. 255 с.
- Худына И.П. Вирусные болезни табака и меры борьбы с ним // Вирусные болезни растений. Краснодар, 1936 а. С. 32–41.
- Худына И.П. Вирусные болезни табака в СССР // Тр. ВНИИ табачной и махорочной промышленности. Краснодар, 1936 б. Вып. 130. 79 с.
- Худына И.П. Сборник работ по болезням табака и махорки // Тр. ВНИИ табачной и махорочной промышленности. Краснодар, 1940. Вып. 41. С. 112–129.
- Цыпленков А.Е. Реакция различных видов, сортов, гибридов томатов на изоляты ВОМ // Тез. совещ. «Теория и практика использования иммунитета с/х культур к вирусным болезням». Вильнюс, 1984. С. 129–130.
- Цыпленков А.Е. Эпифитотия стрика на томатах // Защита и карантин раст. 2008. № 6. С. 40–41.
- Цыпленков А.Е., Власов Ю.И. Вирусные болезни зерновых культур в Ростовской области // Тез. докл. совещ. «Проблемы вирусных болезней зерновых культур и пути их решения». Тверь: ВНИИСХ и ИМЗ, 1993. Ч. 2. С. 6–7.
- Чайка А.К. Селекция сельскохозяйственных культур на Дальнем Востоке // Приоритетные направления в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных растений в XXI веке. М., 2003. С. 178–184.
- Чеголина М.М., Зейрук В.Н. Получение и применение диагностической сыворотки к вирусу У картофеля // Тез. Всесоюз. совещ. «Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними». Ереван, Л., 1978. С. 33–34.
- Черемушкина Н.П. Роль клеща *Cicceria tulipae* К. в естественном распространении вируса мозаики лука // Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1975. Т. 28. С. 174–177.
- Черемушкина Н.П. О распространении вируса мозаики лука семенами // Семеноводство овощных культур.: Тр. ВНИИ. М., 1977. Т. 6. С. 52–54.
- Черемушкина Н.П. Эпифитотия вируса мозаики лука и система мероприятий по борьбе с этой болезнью // Селекции и семеноводства овощных культур: тр. ВНИИ. М., 1982. № 15. С. 74–84.
- Чернявская Н.М. Штаммовый состав вирусов, поражающих овощные культуры на юге Дальнего Востока России: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2003. 114 с.
- Чернявская Н.М., Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. Физические свойства и биологические особенности дальневосточных изолятов вируса огуречной мозаики, поражающего овощные культуры // С.-х. биология. 2002. № 3. С. 109–113
- Чуб В.В., Лезина К.Д. Комнатные растения. М.: ЭКСМО-ПРЕСС, 2000. 229 с.
- Чуян А.Х., Крылова Н.В., Крылов А.В. О некоторых изолятах ВТМ на Дальнем Востоке // Тез. докл. Всесоюз. совещ. по вирусным болезням овощных культур. М.: ВАСХНИЛ, 1974. С. 30–31.
- Чуян А.Х., Крылов А.В. Вирус кольцевой пятнистости гортензии *Hydrangea macrophylla* (Thunb) DC в Приморском крае // Вирусные болезни растений. 1975 а. Т. 22(125). С. 118–120.



- Чуян А.Х., Крылов А.В. X-вирус картофеля на хризантеме // Бюл. ГБС. 1975 б. Вып. 96. С. 64–67.
- Чуян А.Х., Крылов А.В., Малевич В.М. и др. Вирус огуречной мозаики в Приморском крае // Вирусные болезни с/х растений и меры борьбы с ними. М., 1978. С. 147–148.
- Чуян А.Х., Крылов А.В. Свойства вируса аспермии томатов из хризантемы и круг его хозяев в Приморском крае // Бюл. ГБС. 1979. Вып. 114. С. 84–92.
- Чуян А.Х., Стрекозова В.Ф., Крылов А.В. Сравнительная характеристика штаммов вируса табачной мозаики из нарциссов // Тез. докл. совещ. «Вредители и болезни луковичных растений и меры борьбы с ними». Ташкент, 1982. С. 48–49.
- Чуян А.Х., Стрекозова В.Ф., Крылов А.В. Особенности вируса желтой мозаики фасоли, изолированного из гладиолуса в Приморье // Тез. докл. VIII Всесоюз. совещ. «Теория и практика иммунитета с/х культур к вирусным болезням». Вильнюс, 1984. С. 166–168.
- Чуян А.Х., Стрекозова В.Ф., Крылов А.В. Сравнительная характеристика двух штаммов вируса табачной мозаики, изолированных из нарциссов в Приморском крае // Взаимоотношения вирусов с клетками растения-хозяина. Владивосток, 1985. С. 72–78.
- Шаскольская Н.Д., Атабекова Т.И., Сахаровская Г.Н. Комплементация между термочувствительными и термоустойчивыми штаммами ВТМ и формирование смешанных вирусов in vitro // Вирусы и вирусные болезни растений. Киев: Наукова думка, 1974. С. 75–77.
- Шатрова В.М. Идентификация вирусов мозаик лилейных: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1970. 15 с.
- Шафрановская И.В., Козловская З.Н., Толкач В.Ф. и др. Биологические и антигенные свойства дальневосточного изолята ВОМ, выделенного на перце // Фитовирусы Дальнего Востока. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1993. С. 114–121.
- Шелабина Н.Е. Распространенность штаммов вируса У картофеля в элитных посевах сорта Приекульский ранний в Северо-Западной зоне РСФСР // Бюл. ВНИИСХ микробиологии. 1989. № 41. С. 46–47.
- Шелудько Ю.М. Штаммы X-вируса картофеля и их критерии // Штаммы вирусов. Владивосток: ДВНЦ АН СССР. 1977. Т. 46(149). С. 100–106.
- Шимкунас Р.А. Вирусные болезни огурцов в закрытом грунте в некоторых хозяйствах Литвы // Материалы 7-го Прибалтийского совещ. по защите растений. Елгава, 1970. С. 101.
- Шнаар Д. Посевной и посадочный материал сельскохозяйственных культур. Hamburg, 2001 а. Кн. 1. 311 с.
- Шнаар Д. Посевной и посадочный материал сельскохозяйственных культур. Hamburg, 2001 б. Кн. 2. 379 с.
- Штейн-Марголина В.А., Сапоцкий М.В., Крылов А.В. Электронно-микроскопические исследования растений, зараженных вирусом мозаики редиса // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1988. № 1. С. 13–21.
- Штейн-Марголина В.А., Мамлев П.Ю. Диагностика рабдовирусной инфекции методами электронной микроскопии // Тез. IV Республ. конф. «Электронная микроскопия и современная технология». Кишинев, 1990. С. 27.
- Шуберт Й., Рабеништайн Ф., Хрцановска М., Шнаар Д. К проблеме диагностики штаммов Y-вируса картофеля (PVY) // Вестн. защиты растений. СПб., 2004. № 3. С. 3–10.
- Щербинин Б.М. Значение инфекционной нагрузки желтой формы аукуба-штамма ВТМ для развития болезни у томатов // Тр. ВНИИ орошаемого овощеводства и бахчеводства. 1975. Вып. 3/4. С. 227–232.
- Щербинин Б.М., Щербинина Н.М. Носители и резерваторы ВТМ среди дикорастущих травянистых растений Астраханской области // Тр. ВНИИ орошаемого овощеводства и бахчеводства. 1975. Вып. 3/4. С. 221–226.
- Якушева А.С. Вирусные болезни на люпине // Защита растений. 1991. № 11. С. 26.

- Ковачевски И.* Гостоприемници на вируса на жълтата мозаика по фасула в България // Растениевъдни науки. 1972. Т. 9, № 9. С. 123–140.
- Ковачевски И.* Турнепсова мозаика по кръстоцветни и други растения в България // Растениевъдни науки. 1975. Т. 12, № 10. С. 171–181.
- Московецъ С.М., Бобир А.Д., Глушак Л.Ю., Онищенко А.Н.* Вірусні хвороби с.-г. культур. Київ: Урожай, 1975. С. 115–122.
- Московецъ С.М., Фегла Г.І., Глушак Л.Ю.* Деякі вірусні захворювання гарбузових культур в південних областях України // Мікробіол. журн. 1970. № 6. С. 735–738.
- Московецъ С.М., Фегла Г.І.* Вплив вірусу мозаїки кавуна на розвиток гарбузових культур // Мікробіол. журн. 1972. № 2. С. 240–244.
- Поліщук В.П., Будзінівська І.Г., Рижук С.М., Патика В.П., Бойко А.А.* Моніторинг вірусних інфекцій в біоценозах України. Київ: Фітосоціоцентр, 2001. 220 с.
- Руднева Т.О., Будзінівська І.Г., Рижкова А.С., Шевченко Т.П., Демяненко Ф.П., Поліщук В.П.* Характеристика ізолятів вірусу крапчатої мозаїки огурка, виділених з різних регіонів України // Мікробіологічний журн. 2005. Т. 67, № 6. С. 96–103.
- Строїменова Е.* Нов шам тютюнево мозаїчний вірус (ТМВ) по пипера // Градин. лозар. Наука, 1984. № 6, вып. 21. С. 72–78.
- Христова Д., Кайтазова П.* Вірусні болести по домати в България през периода 1986–1994 гг. // Растениевъдни науки. 1996. Vol. 33, N 3. С. 57–59.
- Adam G., Chagas C.M., Lesemann D.E.* Comparison of three plant rhabdovirus isolates by two different serological techniques // Phytopathology. 1987. Vol. 120, N 1. P. 31–43.
- Adams M.J., Accotto G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., et al.* Family Flexiviridae. In Virus Taxonomy. Eighth Rep. Int. Comm. Taxon. Viruses (eds.) C.M. Fauquet, M.A. Mayo J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball). Amsterdam: Elsevier/Academic, 2005. P. 1089–1247.
- Adlerz W.C.* Spring aphid flights and incidence of watermelon mosaic virus 1 and 2 in Florida // Phytopathology. 1974. Vol. 64, N 3. P. 350–353.
- Ahluwat J.S., Chenulu V.V.* Losses due to radish mosaic caused by a strain of turnip mosaic virus and its control // Indian Phytopathol. 1982. Vol. 35, N 2. P. 255–260.
- Ahmed A.H.* Occurrence of watermelon mosaic virus in the Sudan // Tropical Pest Management. 1981. Vol. 27, N 2. P. 279–281.
- Ainsworth G.C.* Mosaic diseases of cucumber // Ann. Appl. Biol. 1935. Vol. 22, N 1. P. 55–67.
- Ainsworth G.C.* Virus diseases // Biol. Exp. Ries. Sta. Cheshunt. 1938. Vol. 21. P. 58–62.
- Albrecht H., Gelbreich A., Menissier de Murcia J.* et al. Cauliflower mosaic virus gene I product detected in a cell-wall-enriched fraction // Virology. 1988. Vol. 163. P. 503–508.
- Al-Kaff N.S., Covey S.N.* Variation in biological properties of cauliflower mosaic virus clones // J. Gen. Virol. 1994. Vol. 75. P. 3137–3145.
- Al-Kaff N.S., Covey S.N.* Biological diversity of cauliflower mosaic-virus isolates expressed in 2 brassica species // Pl. Path. 1995. Vol. 44. P. 516–526.
- Al-Kaff N.S., Covey S.N.* Unusual accumulation of CaMV in local lesion, dark green leaf tissue, and roots of infected plants // Mol. Pl. Microbe Interactions. 1996. Vol. 9. P. 357–363.
- Allam E.K., Ali M.D.H., Abo El-Nasr M.A.* Host range as a mean of differentiation between tomato mosaic virus strains // Egypt. J. Phytopathol. 1978(1979). Vol. 10, N 1. P. 1–7.
- Allington W.B., Moorhead E.L., Staples R.* Alfalfa mosaic virus // Phytopathology. 1960. Vol. 50, N 9. P. 627–631.
- Allison R.F., Johnston R.E., Dougherty W.G.* The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein // Virology. 1986. Vol. 154, N 1. P. 9–20.
- Alper M., Loebenstein M.* Bean yellow mosaic virus isolated from gladiolus in Israel // Phytopathol. Mediterr. 1964. Vol. 3, N 1. P. 26–28.



- AlSaleh M.A., AlShahwan I.M.* Viruses infecting cucurbits in Riyadh, Gassim and Hail regions of Saudi Arabia // Arab. Gulf. J. Sci. Res. 1997. Vol. 15, N. 1. P. 223–254.
- Amparo V.J.* Microbiology // Esp. 1972. Vol. 25, N 4. P. 211–224.
- Anderer F.A., Uhlig H., Weber E., Schramm G.* Primary structure of the protein of tobacco mosaic virus // Nature. 1960. N.186. P. 922–925.
- Anderson C. W.* Two watermelon mosaic virus strains from Central Florida // Phytopathology. 1954. Vol. 44, N 1. P. 198–202.
- Anderson C.W.* A study of field sources and spread of five viruses of peppers in Central Florida // Phytopathology. 1959. Vol. 49, N 2. P. 197–201.
- Ani R., Pfeffer P., Lebeurier G.* The structure of cauliflower mosaic virus. II. Identity and location of the viral polypeptides // Virology. 1979. Vol. 93. P. 188–197.
- Anon.* Antisera serology and electron microscopy // Rep. Inter. Potato Centre. 1978. P. 30–32.
- Anon.* A conspectus of aphids as vectors of plant viruses // J. Gen. Virol. 1990. Vol. 54, N 1. P. 75–90.
- Ansa O.A., Bowyer J.W., Shepherd R.J.* Evidence for replication of cauliflower mosaic virus DNA in plant nuclein // Virology. 1982. Vol. 121. P. 147–156.
- Armour S.L., Melcher T.P., Pirone T.P. et al.* Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA // Virology. 1983. Vol. 129. P. 25–33.
- Atabekov I.G.* Host specificity of plant viruses // Ann. Rev. Phytopathol. 1975. N 1. P. 127–145.
- Atabekov I.G., Schaskolskaya N.D., Demytyeva S.P. et al.* Serological study on barley stripe mosaic virus protein polymerization. I. Immunodiffusion, immunoelectrophoretic characteristics, and absorption experiments // Virology. 1968. Vol. 36, N 4. P. 587–600.
- Atabekov J.G., Morozov S.Y.* Translation of plant messenger RNAs // Adv. Virus Res. 1979. Vol. 25, N 1. P. 1–91.
- Atabekov J.G., Dorokhov Y.L.* Plant virus-specific transport function and resistance of plant to virus // Adv. Virus Res. 1984. Vol. 29. P. 313–364.
- Atabekov I.G., Novikov V.K.* Barley stripe mosaic virus // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1989. N 334. 6 p.
- Atabekov J.G., Taliansky M.E.* Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes // Adv. Virus Res. 1990. Vol. 38, N 2. P. 201–248.
- Atabekov J.G., Malysenko S.I., Morozov S.Yu. et al.* Identification and study of tobacco mosaic virus movement function by complementation tests // Phil. Trans. Res. Soc. Lond. B. 1999. Vol. 354. P. 629–635.
- Atreya C.D., Atreya P.L., Thornbury D.W. et al.* Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants // Virology. 1992. Vol. 191, N 1. P. 106–111.
- Atreya C.D., Pirone T.P.* Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90, N 24. P. 11919–11923.
- Auger J.G., Escaffi O., Nome F.S.* Occurrence of watermelon mosaic virus 2 on cucurbits in Chile // Pl. Dis. Repr. 1974. Vol. 38, N 7. P. 599–602.
- Balazs E., Guilley H., Jonard G., Richards K.* Nucleotide sequence of DNA from an altered-virulence isolate D/H of cauliflower mosaic virus // Gene. 1982. Vol. 19. P. 239–249.
- Bancroft J.B., Heillas G.J., Richardson J.F.* A reevaluation of the structure of narcissus mosaic virus and polymers from its protein // J. Gen. Virol. 1980. Vol. 50, N 2. P. 451–454.
- Bancroft J.B., Moorhead E.L., Tuite J., Lui H.P.* The antigenic characteristics and the relationships among strains of alfalfa mosaic virus // Phytopathology. 1960. Vol. 50, N 1. P. 34–39.
- Banerjee N., Wang J.-Y., Zaitlin M.* A single nucleotide change in the coat protein gene of tobacco mosaic virus is involved in the induction of severe chlorosis // Virology. 1995. Vol. 207, N 1. P. 234–239.

- Bannister A., Maule A., Covey S.* Cauliflower mosaic virus particles alter the sensitivity of *Arabidopsis thaliana* seedlings to 2,4-D // *J. Pl. Physiol.* 1993. Vol. 141. P. 502–504.
- Bassi M., Favali M.A., Conti G.G.* Cell wall protrusions induced by cauliflower mosaic virus in Chinese cabbage leaves: a cytochemical and autoradiographic study // *Virology.* 1974. Vol. 60. P. 353–358.
- Bateson M.F., Henderson J., Chaleeprom W.* et al. Papaya rin potyvirus: isolate variability and the origin of PRSV type (Australia) // *J. Gen. Virol.* 1994. Vol. 75, N 10. P. 3547–3553.
- Bawden F.C.* The viruses causing tip necrosis (aeronecrosis of the potato) // *Ann. Appl. Biol.* 1936. Vol. 26, N 3. P. 487–497.
- Bawden F.C., Rfssanis B.* The behaviour of some naturally occurring strains of potato virus Y // *Ann. Fpl. Biol.* 1957. Vol. 34. P. 503–516.
- Bays D.C., Demsky J.W.* Bean yellow mosaic virus isolate that infects peanut (*Arachis hyrogeae*) // *Plant Dis.* 1986. Vol. 70, N 7. P. 667–669.
- Baughman G., Jacobs J., Howell S.* Cauliflower mosaic virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 733–737.
- Beczner L., Maat D., Bos L.* The relationship between pea necrosis virus and bean yellow mosaic virus // *Nether. J. Pl. Path.* 1976. Vol. 82, N 2. P. 41–50.
- Beczner L., Horvath J., Romhanyi L., Forster H.* Studies on the etiology of the tuber necrotic ringspot disease in potato // *Potato Res.* 1984. N 27. P. 339–352.
- Beczner L., Vassanyi R.* Identification of two strains of white clover mosaic virus // *Acta phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1981. Vol. 16, N 1/2. P. 109–118.
- Bedford I., Kelly A., Blank G.* et al. The effect of Pymetrizine, a feeding inhibitor of Homoptera, in preventing transmission of cauliflower mosaic virus by the aphid species *Myzus persicae* // *Ann. Appl. Biol.* 1998. Vol. 132. P. 453–462.
- Beemster A.B.R., de Bokx J.A.* Survey of properties and symptoms // *PUDOC.* Wageningen. 1987. P. 84–114.
- Behnchen G.M.* Stipple streak of French bean caused by a tobacco necrosis virus in Queensland // *Austral. J. Agr. Res.* 1968. Vol. 19, N 5. P. 731–738.
- Belli G.* Purification of clover mosaic virus // *Rev. Pathol. Veget.* 1967. Vol. 3, N 2. P. 163–176.
- Benfey P., Ren L., Chua N.* Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development // *EMBO J.* 1990 a. Vol. 9. P. 1677–1684.
- Benfey P., Ren L., Chua N.* Combinatorial and synergistic properties of CaMV 35S enhancer subdomains // *EMBO J.* 1990 b. Vol. 9. P. 1685–1696.
- Bercks R.* White clover mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1971. N 41. 4 p.
- Bercks R., Brandes J.* Vergleichende serologische und electronenmikroskopische Untersuchung des Weissklll mosaic-virus des Hydrangea ringspot virus und des Kartoffel-X-virus // *Phytopathol. Z.* 1961. Bd 42, H 1. S. 45–56.
- Bercks R., Querfurth G.* The use of the latex test for the detection of distant serological relationships among plant viruses // *J. Gen. Virol.* 1971. Vol. 12, N 1. P. 25–32.
- Bewley W.F.* Diseases of glasshouse plants // *London Benn.* 1923. 37 p.
- Bhargava B.* Effect of watermelon mosaic virus on the yield of *Cucurbita pepo* // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1977 a. Vol. 12, N 3/4. P. 165–168.
- Bhargava B.* Some properties of two strains of watermelon mosaic virus // *Phytopathol. Z.* 1977 b. Bd 88, H. 3. S. 199–208.
- Bhargawa K.S., Tewari J.P.* *Trichosanthes dioica*, an additional natural host of watermelon mosaic virus // *Pl. Dis. Rep.* 1970. Vol. 54, N 6. P. 723–728.
- Blanco S., Schmidt L., Vantard M.* et al. The aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus forms a stable complex with microtubules in both insect and plant cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 15158–15163.



- Blanco S., Herrera C., Abreu S. Comportamiento de doce variedades de pimiento (*Capsicum annuum*) frente a tres cepas del virus mosaico del tabaco (TMV) // *Science Agr.* 1987. N 31. P. 3-7.
- Blanco-Urgoiti B., Tribodet M., Leclere S., Pons F., Perez de San Roman C., Legorburu F.J., Kerlan C. Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates // *Eur. J. Plant Pathol.* 1998. Vol. 104. P. 811-819.
- Blenowre J.W., Coldarell J. Aspermi - a new virus disease of the tomato // *Ann. Appl. Biol.* 1949. Vol. 36, N 3. P. 320-326.
- Boeke J.D., Eickbush T.N., Sandmeyer S.B., Voytas D.F. Virus Taxonomy: ISTV. VII-th report. N. Y.: Springer-Verlag, 2000.
- Bokx J.A. de, Huttinga H. Potato virus Y // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. Commonw. Mycol. Inst./ Assoc. Appl. Biol. Kew, Englang.* 1981. N 242. 4 p.
- Bokx J.A. de, Kratchaneva B., Maat D.L. Some properties of a deviating strain of potato virus Y // *Potato Res.* 1975. Vol. 18, N 38. P. 51-59.
- Bonneville J., Volovitch M. et al. In vitro synthesis of cauliflower mosaic virus DNA in viroplasm // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1984. Vol. 179. P. 113-119.
- Boonham N., Walsh K., Hims M., Preston S., North J., Barker I. Biological and sequence comparisons of potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease // *Pl. Path.* 2002 a. Vol. 51. P. 117-126.
- Boonham N., Walsh K., Hims M., Preston S., North J., Barker I. The detection of tuber necrotic isolates of potato Y, and the accurate determination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. // *J. Virol. Methods.* 2002 b. Vol. 102. P. 103-112.
- Borgstrom B., Johanson I.E. Mutation in Pea seedborne mosaic virus genome-linked protein VPg after pathotype-specific virulence in *Pisum sativum* // *Mol. Pl. Microbe Interactions.* 2001. Vol. 14. P. 707-714.
- Borneman J., Tritz R., Hampel A., Altschuler M. Detection of cleavage products from an in vivo transcribed cis hairpin ribozyme in turnips using the CaMV plant virus // *Gene.* 1995. Vol. 159. P. 137-142.
- Bos L. Bean yellow mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1970. N 40. 4 p.
- Bos L. Bean common mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1971. N 73. 4 p.
- Bos L., Jaspars M. Alfalfa mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1971. N 46. 4 p.
- Bos L., Huijberis N., Huttinga H., Maat D.Z. Leek yellow stripe and its relationships to onion yellow dwarf virus: characterization, ecology and possible control // *Neth. J. Plant Pathol.* 1978. Vol. 84, N 5. P. 185-204.
- Boye K., Jensen P.T., Stumman B.M., Henningsen K.W. Nucleotide sequence of sDNA encoding the BYMV coat protein // *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18(16), N 42. P. 1203-1205.
- Brandes J., Bercks R. Cross morphology and serology as a basis for the classification of elongated plant viruses // *Adv. Virus Res.* 1965. Vol. 11. P. 1-24.
- Brandes J., Wetter C. Classification of elongated plant viruses on the basis of their particle morphology // *Virology.* 1959. Vol. 8, N 1. P. 99-115.
- Brants D.H., Van den Heuvel J. Investigation of Hippeastrum mosaic virus in *Hippeastrum hybridum* // *Neth. J. Pl. Path.* 1965. Vol. 71, N 2. P. 145-149.
- Brierley P. Diseases of Amaryllidaceae excluding those of *Allium* and *Narcissus* // *Herbertia. La Jolla.* 1948. Vol. 15, N 2. P. 113-117.
- Brierley P. Symptoms in the florist's hydrangea caused by tomato ringspot virus and an unidentified sap-transmissible virus // *Phytopathology.* 1954. Vol. 42, N 12. P. 696-699.
- Brierley P., Smith F.F., Doolittle S.F. Experiments with tomato aspermy virus from *chrisanthemums* // *Phytopathology.* 1963. Vol. 43, N 7. P. 404.
- Bridgmon G.H., Walker J.C. *Gladiolus* as a virus reservoir // *Phytopathology.* 1952. Vol. 42, N 1. P. 65-70.
- Brisson N., Hohn T. Plant-virus vectors - cauliflower mosaic virus // *Methods Enzym.* 1986. Vol. 118. P. 659-668.

- Brisson N., Paszkowski J., Penswick J.* et al. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector // *Nature*. 1984. Vol. 310. P. 511–514.
- Broadbent L.* Investigation of virus diseases of Brassica crops // *Agr. Res. Coun. Rep. Ser.* 1957. Vol. 14. P. 12–19.
- Broglio E.* Mutational analysis of cauliflower mosaic virus gene VI – changes in host-range, symptoms, and discovery of transactivation-positive, noninfectious mutants // *Mol. Pl. Microbe Interactions*. 1995. Vol. 8. P. 755–760.
- Brown J.C., Newcomb W.W.* *Rhabdoviridae* // *Animal virus structure*. Elsevier Science. Rublishers. B.V. (Biomedical Division). 1987. P. 199–212.
- Bruckart W.L., Lorbeer J.W.* Cucumber mosaic virus in weed hosts near commercial fields of lettuce and celery // *Phytopathology*. 1976. Vol. 66, N 3. P. 253–259.
- Bruening G.* Comovirus group // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1978. N 119. 4 p.
- Brunt A.A.* The occurrence of cucumber mosaic virus and four nematode transmitted viruses in British narcissus crops // *Pl. Path.* 1966. Vol. 15, N 2. P. 157–160.
- Brunt A.A.* Partial purification, morphology, and serology of dahlia mosaic virus // *Virology*. 1966. Vol. 28. P. 778–780.
- Brunt A.A.* Dahlia mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1971. N 51. 4 p.
- Brunt A.A.* Hippeastrum mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1973. N 117. 3 p.
- Brunt A.A., Barton R., Tremaine J., Stacemith R.* Composition of cauliflower mosaic virus protein // *J. Gen. Virol.* 1975. Vol. 27, N 1. P. 101–106.
- Brunt A.A.* et al. Viruses of Plants // *Descr. and lists from the VIDE Database*. 1995. P. 1–200.
- Brunt A.A.* et al. Tobacco necrosis virus // *Descr. and lists from the VIDE Database*. Wallingford: Univ. Press. UK, Cambridge (London). 1996. P. 1256–1259.
- Brunt A.A.* et al. Alfalfa mosaic virus // *Ibid* 1996. P. 184–187.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L., Zurcher E.* Cucumber mosaic cucumovirus // *Pl. Viruses Descr. and lists from the VIDE Database*. 1997. P. 476–486.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J.* et al. Watermelon mosaic I potyvirus // *Pl. Viruses Descr. and lists from the VIDE Database*. 1997 a. P. 731–738.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J.* et al. Malva vein clearing potyvirus // *Pl. Viruses Descr. and lists from the VIDE Database*. 1997 b. P. 777–778.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M. J.* et al. Pea streak carlavirus // *Pl. Viruses Descr. and lists from the VIDE Database*. 1997 c. P. 912–914.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J.* et al. Broad bean wild fabavirus // *Pl. Viruses Descr. and lists from the VIDE Database*. 1997 d. P. 2361–264.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Watson L.* Odontoglossum ringspot tobamovirus // *Descriptions and lists from the vide database*. 1997 e. P. 532. 842–844, 863–864, 861–863.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J.* et al. Tobamoviruses // *Ibid.* (1996 onwards) 1997 a. 8 pp.
- Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J.* et al. Tobacco mosaic tobamovirus // *Ibid.* (1996 onwards) 1997 b. 8 p.
- Bruyn Ouctober M.P. de, Van Slogteren E.* Het Augustaziek der yulpen een virus – ziekte van het tabak-nekrosetype // *Tijdschr. Plantenziekt.* 1949. Vol. 55, N 5. P. 262–271.
- Burger J., Du Plessis D.* Detection of partially proteolyzed cauliflower mosaic virus coat protein in infected leaf tissue by western blotting // *J. Virol. Methods*. 1983. Vol. 7. P. 11–19.
- Butler P. J.* The current picture of the structure and assembly of tobacco mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1984. Vol. 65, N 2. P. 253–279.
- Butterfield F.J., Tolin S.A., Lambe R.C.* Watermelon mosaic viruses causes a serious disease of pumpkin in Southwestern Virginia // *Phytopathology*. 1983. Vol. 73, N 6. P. 964–968.
- Buturovic D., Grbelja J.* Nalaz virusa nekroze du hana uheljdi // *Acta bot. croat.* 1978. Vol. 37, N 1. P. 33–37.
- Cadman C.H.* Biology of soil-borne viruses // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1963. Vol. 1, N 2. P. 143–172.
- Campbell R.N.* Radish mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1973. N 121. 4 p.



- Campbell R.N. Radish mosaic virus serologically related to strain of been pod mottle virus and to squash mosaic virus // *Phytopathology*. 1964. Vol. 54, N 11. P. 1418-1424.
- Candresse T., German S., Lanneau M., Dunez J. In vitro translation of apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) RNA // *Virology*. 1996. Vol. 141, N 11. P. 2031-2043.
- Canto T., Choi S.K., Palukaitis P. A subpopulation of RNA 1 of cucumber mosaic virus contains 3'-termini originating from RNAs 2 or 3 // *J. Gen. Virol.* 2001. Vol. 82, N 4. P. 941-945.
- Canto T., Prior D.A.M., Hellwald K.H. et al. Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus // *Virology*. 1997. Vol. 237, N 2. P. 237-248.
- Capoor S.P., Rao D.J., Sawant D.M. Seed transmission of French bean mosaic virus // *Phytopathology*. 1986. Vol. 39, N 5. P. 343-345.
- Carfune E.E., Perotto M.C., Conci V.C. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield // *Plant Disease*. 2006. Vol. 90, N 7, P. 808-904.
- Castello J.D., Lakshman D.K., Tavantzis S.M. et al. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds // *Plant Disease*. 1995 a. Vol. 85, N 10. P. 1138.
- Castello J.D., Lakshman D.K., Tavantzis S.M., Rogers S.O., Bachahd G.D., Jagels R., Carlisle J., Liu Y. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds // *Plant Disease*. 1995 b. Vol. 85, N 11. P. 1409-1412.
- Cayley D.M. Breaking in tulips // *Ann. Appl. Biol.* 1928. Vol. 15, N 3. P. 529-539.
- Cayley D.M. Breaking in tulips // *Ann. Appl. Biol.* 1932. Vol. 19, N 1. P. 153-172.
- Cerovska N. Production of monoclonal antibodies to potato virus YNTN strain and their use for strain differentiation // *Pl. Path.* 1998. Vol. 47. P. 505-509.
- Chapdelaine Y., Hohn T. The cauliflower mosaic virus capsid protein: assembly and nucleic acid binding in vitro // *Virus Genes*. 1998. Vol. 17. P. 139-150.
- Chapdelaine Y., Kirk D., Karsies A. et al. Mutation of capsid protein phosphorylation sites abolishes cauliflower mosaic virus infectivity // *J. Virol.* 2002. Vol. 76. P. 11748-11752.
- Chen B., Francki R.I.B. Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 4. P. 939-944.
- Chen B., Chen J., Adams M.J. Molecular characterization of a complex mixture of viruses in garlic with mosaic symptoms in China // *Arch. Virol.* 2001. Vol. 146. P. 1841-1853.
- Chenault K., Melcher U. Patterns of nucleotide sequence variation among cauliflower mosaic virus isolates // *Biochimie*. 1994. Vol. 76. P. 3-8.
- Chenault K., Melcher U. Phylogenetic relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic virus // *J. Mol. Evol.* 1994. Vol. 39. P. 496-505.
- Cheng R.H., Olson N.H., Baker T.S. Cauliflower mosaic virus: a 420 subunit (T=7), multilayer structure // *Virology*. 1992. Vol. 186. P. 655-668.
- Cherian S., Joseph J., Muniyappa V., Savithri H.S. Characterization of tobacco mosaic virus isolated from tomato in India // *Current Science*. 1999. Vol. 76, N 10. P. 1384-1388.
- Cho J.J., Ullman D.E., German T.L. et al. Viral diseases associated with cucurbits crops in Hawaii // *Phytopathology*. 1989. Vol. 79, N 10. P. 1194-1198.
- Choi J.K., Maeda T., Wakimoto S. Serological properties of turnip mosaic virus // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1978. Vol. 44, N 1. P. 14-21.
- Christie R.G., Edwardson J.R. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Gainesville: Florida Agr. Exp. Stat. 1977. 155 p.
- Chrzanowska M. Nowe izolaty wirusa Y zagrazajaze ziemniakom w Polsce // *Hodowla Roslin I Nasiennictwo*. 1987. N 5-6. S. 8-11.
- Chrzanowska M. New isolates of the necrotic strain of Potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. // *Potato Res.* 1991. N 34. S. 179-182.
- Citovsky V., Knorr D., Zambryski P. Gene-I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 2476-2480.

- Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses // *J. Gen. Virol.* 1977. Vol. 34, N 3. P. 475–482.
- Clarke D.D. Tolerance of parasites and disease in plants and its significance in host-parasite interactions // *Adv. Pl. Pathol.* 1986. Vol. 5. P. 397–411.
- Cocking E.C., Pojnar E. An electron microscopic study of the infection of isolated tomato fruit protoplasts by tobacco mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1969. Vol. 49, N 2. P. 305–312.
- Cohen S., Nitzany F. Identify of viruses affecting cucurbits in Izrael // *Phytopathology.* 1963. Vol. 53, N 2. P. 193–196.
- Conti G.G., Vegetti G., Bassi M., Favali M. Some ultrastructural and cytochemical observations on Chinese cabbage leaves infected with cauliflower mosaic virus // *Virology.* 1972. Vol. 96. P. 694–770.
- Costa A.S., Kitajima E.W. Cassava common mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1971. N 90. 4 p.
- Covey S.N., Hull R. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of transcripts, properties, and location of the gene encoding the virus inclusion body protein // *Virology.* 1981. Vol. 111. P. 463–474.
- Covey S.N., Turner D.S. Changes in population of cauliflower mosaic virus DNA and RNA forms during turnip callus proliferation // *J. Gen. Virol.* 1993. Vol. 74. P. 1887–1839.
- Covey S.N., Turner D.S., Lusy A.P., Saunders K. Host regulation of cauliflower mosaic virus replication cycle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87, N 43. P. 1633–1637.
- Crosslin J.V., Hamm P.B., Stiel P.J., Hane D.C., Brown C.R., Berger P.H. Serological and molecular detection of tobacco weinal necrosis isolates of Potato virus Y (PVY<sup>N</sup>) from potatoes grown in the western United States // *Am. J. Potato Res.* 2005. N 82. P. 263–269.
- Culver J.N., Dawson W.O. Point mutations in the coat protein gene of tobacco mosaic virus induce hypersensitivity in *Nicotiana glauca* // *J. Mol. Biol.* 1989. Vol. 2, N 4. P. 209–213.
- Daubert S., Shepherd R., Gardner R. Insertion mutagenesis of cauliflower mosaic virus genome // *Gene.* 1983. Vol. 25. P. 201–208.
- Dautel S., Guidasci T., Pique M. et al. The full-length product of cauliflower mosaic virus open reading frame III is associated with the viral particles // *Virology.* 1994. Vol. 202. P. 1043–1045.
- Dawson W.O., Lehto K.M. Regulation of tobamovirus gene expression // *Adv. Virus Res.* 1990. Vol. 38, N 2. P. 307–342.
- Day M.F., Venables D.G. The transmission of cauliflower mosaic virus by aphids // *Austral. J. Biol. Sci.* 1961. Vol. 14, N 2. P. 187–197.
- Dedic P., Placek J. The diversification of PVY biological and differentiation // *Beitr. Zicchz. Fors.* 2000. Vol. 6. P. 41–44.
- Demski J.W., Chalkley J.H. Effect of watermelon mosaic virus on yield and marketability of summer squash // *Pl. Dis. Repr.* 1972. Vol. 56, N 2. P. 147–150.
- Demski J.W., Chalkley J.H. Influence of watermelon mosaic virus on watermelon // *Pl. Dis. Repr.* 1974. Vol. 58, N 3. P. 195–198.
- Devergne J.-C., Cardin L. Contribution a l'etude du virus de la mosaïque du concombre (CMV). IV. Essai de classification de plusieurs isolates sur la base de leur structure antigenique // *Ann. Phytopathol.* 1973. Vol. 5, N 4. P. 409–430.
- Devic M., Jaegle M., Baulcombe D. Cucumber mosaic virus satellite RNA (strain Y): analysis of sequences which affect systemic necrosis on tomato // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 7. P. 1443–1449.
- De Zoeten G.A. Early events in plant virus infection // *Plant disease and vectors: ecology and epidemiology.* N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 221–239.
- Diaz F.F. Identification and distribution of watermelon mosaic virus 1 in El Salvador // *Pl. Dis. Repr.* 1972. Vol. 56, N 5. P. 437–440.
- Ding S.W., Kuse P., Gibbs A. The nucleotide sequence of the genomic RNA of Kennedy yellow mosaic tymovirus – Jervis Bay isolate: Relationships with potex and carlaviruses // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 4. P. 925–931.



- Ding S.W., Anderson B., Haase H., Symons R.H. New overlapping gene encoded by the cucumber mosaic virus genome // *Virology*. 1994. Vol. 198, N 2. P. 593-601.
- Dixon L., Koenig I., Hohn T. Mutagenesis of cauliflower mosaic virus // *Gene*. 1983. Vol. 25. P. 189-199.
- Domier L.L., Shaw J.G., Rhoads R.E. Potyviral proteins share amino acid sequence homology with picorna-, como- and caulimoviral proteins // *Virology*. 1987. Vol. 158, N 1. P. 20-27.
- Dominguez D., Hohn T., Schmidt-Puchta W. Cellular proteins bind to multiple sites of the leader region of cauliflower mosaic virus 35S RNA // *Virology*. 1996. Vol. 226, N 2. P. 374-383.
- Doolittle S.P. The mosaic disease of Cucurbets // U.S. Dept. Bull. 1920. N 879. P. 1-69.
- Doolittle S.P., Anderson L. Occurrence of Tobacco etch virus on greenhouse Tomatoes in Ohio // *Pl. Dis. Repr.* 1951. Vol. 35, N 8. P. 351-352.
- Dorokhov Y.L., Mckinen K., Frolova O.Yu. et. al. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylsterase: the hosticell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein // *FEBS*. 1999. Vol. 461. P. 223-228.
- Dougherty W.G., Hiebert E. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: cell-free translation strategy and a genetic map of the potyviral genome // *Virology*. 1980 a. Vol. 104, N 1. P. 183-194.
- Dougherty W.G., Hiebert E. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: reaction conditions and identification of capsid protein as one of the products of in vitro translation of tobacco etch and pepper mottle viral RNAs // *Virology*. 1980 b. Vol. 101, N 2. P. 466-474.
- Dougherty W.G., Willis L., Johnston R.E. Topographic analysis of tobacco etch virus capsid protein epitopes // *Virology*. 1985. Vol. 144, N 1. P. 66-72.
- Drucker M., Froissart R., Hebrard E. et al. Intracellular distribution of virus gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. Vol. 19. P. 2422-2427.
- Drushout E., Silbernagel M.J., Bukke D.W. Differentiation of strain of bean common mosaic virus // *Neth. J. Pl. Path.* 1978. Vol. 84, N 1978. P. 13-26.
- Ducasse D.A., Mushegian A.R., Sheperd R.J. Gene-I mutants of peanut chlorotic streak virus, a caulimovirus, replicate in plants but, do not move from cell to cell // *J. Virol.* 1995. Vol. 69. P. 5781-5786.
- Duds M.C., Van Regenmortel M.H.V. Odontoglossum ringspot virus coat protein: sequence and antigenic comparisons with other tobamoviruses // *Arch. Virol.* 1990. Vol. 115, N 3/4. P. 239-249.
- DuPlessis D.H., Wechmar M.B. Detection of cauliflower mosaic virus in leaf extracts, protoplasts and aphids by ELISA // *Phytopathol. Z.* 1981. Bd 100. S. 270-278.
- Ebrahim-Nesbat F. Distribution of watermelon mosaic virus 1 and 2 in Iran // *Phytopathol. Z.* 1974. Bd 79, N 2. S. 352-358.
- Edington B.R., Whitlock V.H. Identification of an isolate of bean common mosaic virus from the Transval and Natal // *Ann. Appl. Biol.* 1988. Vol. 113, N 3. P. 654-648.
- Edwardson J.R. Electron microscopy of cytoplasmic inclusions in cell infected with rod-shaped viruses // *Botany*. 1966. Vol. 53, N 2. P. 359-363.
- Edwardson J.R. Some properties of the potato virus Y-group // *Florida Agr. Exp. Sta. Monograph*. Ser. 4. 1974. 398 p.
- Edwards M.C., Gonsalves D. Grouping of seven biologically defined isolates of cucumber mosaic virus by peptide mapping // *Phytopathology*. 1983. Vol. 73, N 8. P. 117-1120.
- Elliot M.S., Zettler F.W., Zimmerman M.T., Barnett O.W., Legrande M.D. Problems with interpretation of serological assays in a virus survey of orchid species from Puerto-Rico, Ecuador, and Florida // *Pl. Dis.* 1996. Vol. 80, N 10. P. 1160-1164.
- Erickson J.W., Bancroff J.B. The self-assembly of papaya mosaic virus // *Virology*. 1978. Vol. 90, N 1. P. 36-46.
- Esau K. *Viruses in plant hosts. Form, distribution and pathologic effects.* Madison, Milwaukee, L.: Univ. Wisconsin Press, 1968. 225 p.

- Esau K., Cronshaw T.J.* Tubular components in cells of healthy and tobacco mosaic virus-infected *Nicotiana* // *Cell Biol.* 1967. Vol. 33, N 3. P. 665–678.
- Eseriu F., Perry K.L., Garcia-Arenal F.* Transmissibility of cucumber mosaic virus by *Aphis gossypii* correlates with viral accumulation and its affected by the presence of its satellite RNA // *Phytopathology*. 2000. Vol. 90, N 10. P. 1068–1072.
- Espinosa A.M., Markham P.G., Maule A.J., Hull R.* In vitro biological activity associated with the aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1988. Vol. 69. P. 1819–1830.
- Eui-Kyoo, Goodman R.H.* Strains of soybean classification based on virulence in resistant soybean cultivars // *Etyology*. 1972. Vol. 69, N 5. P. 467–473.
- Fauquet C. M., Mayo M.A.* Abbreviations for plant virus names-1999 // *Arch. Virol.* 1999. Vol. 144, N 6. P. 1249–1273.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.* Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Danforth Science Centre. Univ. Missouri. Stat Louis: Acad. Press, 2005. 1162 p.
- Feldhoff A., Wetzel T., Peters D., Kellner R., Krezal G.* Characterization of petunia flower mottle virus (PetFMV), a new potyvirus infecting *Petunia x hybrida* // *Arch. Virol.* 1998. Vol. 143, N 5. P. 475–488.
- Feldman J.M., Gracia O.* Studies of weed plants as sources of viruses. III. Natural infections of some weeds with tobacco mosaic, cucumber mosaic and potato Y viruses // *Phytopathol. Z.* 1972. Bd 73, H 3. S. 251–255.
- Feldman J.M., Oremianer S.* An unusual strain of tobacco mosaic virus from pepper // *Phytopathol. Z.* 1972. Bd 75, H 3. S. 250–267.
- Feng L., Tian R., Yang C.Y.* Обследование и идентификация на томатах вирусов и штаммов TMV, CMV в Северном Китае // *Zhiwu baohu xuebao (Acta phytophylacica Sin.)* 1996. Vol. 23, N 1. P. 51–55.
- Fenner F.* Classification and nomenclature of viruses // *Intervirology*. 1976. Vol. 7, N 1/2. P. 65–90.
- Filho P.A.M., Nagata T., Dusi F.N., Buso J.A., Torres A.C., Eiras M., Oliveira Resende R.* Detection on three Allexivirus species infecting garlis in Brazil // *Pesq. Agropec. Bras.* 2004. Vol. 39. P. 735–740.
- Fischer H.U., Lockhart B.E.L.* Serious losses in cucurbits caused by watermelon mosaic virus in Morocco // *Pl. Dis. Repr.* 1974. Vol. 58, N 1. P. 143–146.
- Fischer H.U., Lockhart B.E.L.* A moroccan isolate of turnip mosaic virus infection to garden pea and other legumes // *Pl. Dis. Repr.* 1976. Vol. 60, N 3. P. 398–401.
- Franck A., Guilley H., Jonard G. et al.* Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA // *Cell*. 1980. Vol. 21. P. 285–294.
- Francki R.I.B., Habili N.* Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q strains) by formaldehyde // *Virology*. 1972. Vol. 48, N 2. P. 309–315.
- Francki R.I.B., Hatta T.* Nepovirus (tobacco ringspot virus) group // *The Atlas of Insect and Plant Virus* / ed. K. Maramorosh, N. Y.: Acad. Press, 1977. P. 221–295.
- Francki R.I.B., Hatta T., Milne R.G.* An atlas of plant viruses // Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985. Vol. 1. 284 p.
- Francki R.I.B., Fauquet C.M., Knudsen D.I., Brown F.* Classification and nomenclature of virus. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Wien; N. Y.: Springer-Verlag, 1991. 223 p.
- Franki R.I.B., McLean G.D.* Purification of potato virus X and preparation on infection ribonucleic acid by degradation with lithium chloride // *Austral. J. Biol. Sci.* 1968. Vol. 21, N 6. P. 1311–1318.
- Francki R.I.B., Randies J.W., Chambers T.C. et al.* Some properties of purified cucumber mosaic virus (Q strain) // *Virology*. 1966. Vol. 28, N 4. P. 729–741.
- Freitag J.H.* Seven virus diseases of cucurbits in California // *Phytopathology*. 1952. Vol. 42, N 1. P. 8–14.
- Freitag J.H.* Beetle transmission host range and properties of squash mosaic virus // *Phytopathology*. 1956. Vol. 46, N 1. P. 73–81.



- Frencel I., Pospieszny H.* Viruses in natural infections of yellow Lupin (*Lupinus luteus* L.) in Poland // In Bean Common Mosaic Virus (BCMV). Acta. Phytopatol. Acad. Sci. Hung. 1980. Vol. 14, N 3/4. P. 279-284.
- Fribourg C.E., Nakashima J.* An improved latex agglutination test for routine detection of potato viruses // Potato Res. 1984. Vol. 27, N 3. P. 237-249.
- Friedt W.* Resistance to bymoviruses in Poaceae with special consideration of the yellow mosaic viruses complex // Abstr. Conf. Virus Diseases of Poaceae in Europe. INPA. Versailles, France. 1995. P. 35.
- Fry P.R., Campbell R.N.* The nature of relationship between *Olpidium* zoospores and tobacco necrosis virus // Phytopathology. 1966. Vol. 56, N 2. P. 146.
- Fulton J.R.* Factors related to soil transmission of tobacco ringspot virus // Phytopathology. 1962. Vol. 52, N 1. P. 163-166.
- Fulton R.W., Scott H.A.* Beetles // Vector of plant pathogenic / eds Harris K.F., Maromrosch K. Acad. Press, 1980. N 9. P. 115-132.
- Furusawa I., Okuno T.* Infection with BMV of mesophyll protoplasts isolated from five plant species // J. Gen. Virol. 1978. Vol. 40. P. 489-491.
- Futterer Y., Gordon K., Sanfacon H.* et al. Positive and negative control of translation by the leader sequence of cauliflower mosaic virus pregenomic 35S RNA // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 1697-1707.
- Futterer Y., Kiss-Laszlo Z., Hohn T.* Nonlinear ribosome migration on CaMV 35S RNA // Cell. 1993. Vol. 73. P. 789-802.
- Futterer Y., Bonneville J., Hohn T.* Cauliflower mosaic virus as a gene expression vector for plants // Physiologia Plantarum. 1990. Vol. 79. P. 154-157.
- Gaborjanyi R., Tobias I.* Rocketimmunoelectrophoresis a novel method for quantitative detection of barley stripe mosaic virus from infected barley and wheat plants // Gen. Res. Commun. 1984. Vol. 12, N 4. P. 263-264.
- Gal-On A., Kaplan L., Roossick M.J., Palukaitis P.* The kinetics of infection of zucchini squash by cucumber mosaic virus indicate a function for RNA1 in virus movement // Virology. 1994. Vol. 205, N 2. P. 280-289.
- Gardner M.W., Kendrick J.B.* Soybean mosaic // J. Agr. Res. 1921. Vol. 22, N 2. P. 111-114.
- Garrett R.* Cauliflower mosaic virus // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1982. 7 p.
- Gebre S., Dumas V., Marchoux G., Pochard E.* La virus de la mosaïque du tabac chez le piment. I. Apparition en France du pathotype P 1-2 // Agronomie. 1981. N 10. P. 853-858.
- Gera A., Loebenstein G., Racchah B.* Detection of cucumber mosaic virus in viruliferous aphids by enzyme-linked immunosorbent assay // Virology. 1978. Vol. 86, N 2. P. 542-545.
- George R.A., Converse R.H.* Methods for the enrichment of desired B-cell population before anti-cauliflower mosaic virus hybridoma formation // Phytopathology. 1988. Vol. 78. P. 1631-1636.
- Geri C., Cacchini E., Giannakou M.C.* et al. Altered patterns of gene expression in *Arabidopsis* elicited by cauliflower mosaic virus infection and by a CaMV gene VI transgene // Mol. Pl. Microbe Interactions. 1999. Vol. 12. P. 377-384.
- Giband M., Stoeckel M., Lebeurier G.* Use of the immune-gold technique for in situ localization of cauliflower mosaic virus particles and the major protein of the inclusion bodies // J. Virol. Methods. 1984. Vol. 9. P. 277-281.
- Giband M., Mesnard J., Lebeurier G.* The gene III product (P15) of cauliflower mosaic virus is a DNA-binding protein while an immunologically related PII polypeptide is associated with virions // EMBO J. 1986. Vol. 5. P. 2433-2438.
- Gibbs A.J.* Tobamovirus group // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1977. N 184. 5 p.
- Giri L., Chessin M.* A severe strain of Tobacco mosaic virus from cactus // Phytopathology. 1975. Vol. 65, N 6. P. 824-825.
- Giri L., Chessin M.* Zygocactus virus X // Phytopathol. Z. 1975. Bd 83, H. 1. S. 40-48.
- Glais L., Tribodet M., Gauthier J.P.* et al. PFLP mapping of the whole genome of the viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y // Arch. Virol. 1998. Vol. 143. P. 2077-2091.

- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Molecular detection of particular PVY isolates: pvyNTN and pvy<sup>NW</sup> // The 11-th EAPR Virology Section Meeting, Havlickuv Brod-Trest. 2001. P. 70–71.
- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Genomic variability in Potyvirus Y (PVY) evidence that PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>0</sup> and PVY<sup>N</sup> isolates // Arch. Virol. 2002. Bd 147. S. 363–378.
- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Specific detection of the PVY<sup>NW</sup> variant of *Potato virus Y* // J. Virol. Methods. 2005. Vol. 125. P. 131–136.
- Gnutova I.V., Tolkach V.F., Gnutova R.V. Identification of TMV strains from eggplant, tomato and pepper on biological properties // Abstr. IV-th conf. I.S.H.S. «Vegetable virus working group». Torino Ispozizioni. 1998. P. 6.
- Gnutova R.V. Analysis diversity species and strains of phytoviruses in agrozenosis of the Asian territory in Russia // Abstr. VI-th int. simpos. Plant virus epidemiology. Aschersleben, Germany. 2002. P. 123.
- Gnutova R.V., Sibiryakova I.I., Romanova S.A. Cucumber mosaic virus on peper and squash // Mater. 8-th Inter. Conf. «Virus diseases vegetable». Prague, Czech. Republic. 1995. P. 136–139.
- Gnutova R.V., Tolkach V.F. Taxonomy of the family Potyviridae // Arch. Phytopathol. Pflanz. 1998. Vol. 31. P. 543–548.
- Gnutova R.V., Tolkach V.F., Gnutova I.V., Spaar D. Viren als krankheitserreger bei gemusekulturen in sudden der Fernostlichen region Russlands // Arch. Phytopathol. Pflanz. 2002. Vol. 35. P. 7–21.
- Gnutova R.V., Tolkach V.F., Bogunov Yu.V. Criteria for identification of cauliflower mosaic viruses of the Far Eastern strains // Pl. Protect. Sci. 2002. Vol. 38 (Special Issue). P. 258–260.
- Gnutova R.V., Tolkach V. F. Typical Russian Strain of Tobacco Necrosis Virus // Mater. VIII-th Inter. Working Group Plant viruses wich fungal vectors / ed. Rush C.M. Bolonga. 2005. P. 57–60.
- Gold A.H. A tobacco-necrosis-like virus isolated from potato tubers lessions and California soils // Phytopathology. 1960. Vol. 50, N 1. P. 84–87.
- Goldberg K., Kiernan J., Shepherd R. A disease syndrome associated with expression of gene-VI of caulimoviruses may be a nonhost reaction // Mol. Pl. Microbe Interactions. 1991. Vol. 4. P. 182–189.
- Gong Z.X., Wu H., Cheng R.H., Hull R., Rossmann M. G. Crystallization of cauliflower mosaic virus // Agronomie. 1990. Vol. 10. P. 749–758.
- Gonsalves D., Providenti R., Edwards M.C. Tomato white leaf: the relation of an apparent satellite RNA and cucumber mosaic virus // Phytopathology. 1982. Vol. 72, N 12. P. 1533–1538.
- Gordeichuk O.G., Krylov A.V., Krylova N.V., Samonina I.N. Virus of some mechanically transmitted viruses detected in Primorye territory // Zbl. Bakt. Parasitink. Infektion. Hyg. Abt. 2. 1977. Bd 132, H. 8. S. 686–707.
- Gotz R., Huth W., Maiss E. Molecular analyses of the coat protein region of different viruses on Poaceae belonging to the Potyviridae // Abstr. Conf. Virus Diseases of Poaceae in Europe. INPA. Versailles, France. 1995. P. 23.
- Govier D.A., Kassanis B. Evidence that a component other than the virus particle is need for aphid transmission of potato virus Y // Virology. 1974. Vol. 57, N 1. P. 285–286.
- Govier D.A., Kassanis B., Pirone T.B. et al. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component // Virology. 1977. Vol. 78, N 1. P. 306–314.
- Gould A.R., Palucitis P., Symons R.H. et al. Characterization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus // Virology. 1978. Vol. 84, N 2. P. 443–455.
- Gracia O., Shepherd R. Cauliflower mosaic virus in the nucleus of Nicotiana // Virology. 1985. Vol. 146, N 2. P. 141–145.
- Granett A.L., Providenti R. Partial purification and serological relationship of three strains of bean yellow mosaic virus // Ann. Appl. Biol. 1975. N 81. P. 413–415.
- Granier F., Durand D.P., Tardif M., Casse-Delbart F., Lecoq H., Robaglia C. Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility // J. Gen. Virol. 1993. Vol. 74, N 12. P. 2737–2742.



- Greber R.S. Watermelon mosaic virus-1 and virus-2 in Queensland cucurbit crops // *Austral. J. Agr. Res.* 1978. Vol. 29, N 6. P. 1235-1245.
- Greenleaf W., Cook A., Heyn A. Resistance to tobacco mosaic in *Capsicum* with reference to the Samsun latent strain // *Phytopathology*. 1964. Vol. 54, N 11. P. 1367-1371.
- Grogan R.G. A pod distorting strain of the yellow bean mosaic virus // *Phytopathology*. 1948. Vol. 38, N 1. P. 10-16.
- Grogan R.G., Hall D.H., Kimble K.A. Cucurbit mosaic viruses in California // *Phytopathology*. 1959. Vol. 49, N 6. P. 366-376.
- Gugerli P., Fries P. Utilisation d'anticorps monoclonaux pour estion par le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre // *Rev. Suisse Agr.* 1979. N 11. P. 253-260.
- Gugerli P., Fries P. Characterization of monoclonal to potato virus Y and their use for virus detection // *J. Gen. Virol.* 1983. Vol. 64, N 12. P. 2471-2477.
- Gusui W., Kaper J.M. et al. Tomato necrosis and the 369 nucleotide Y satellite of cucumber mosaic virus: factors affecting satellite biological expression // *J. Gen. Virol.* 1993. Vol. 74, N 2. P. 161-168.
- Haack I., Richter J. Differenzierung von Isolaten des Gurkenmosaik - Virus (cucumber mosaic virus) mit Hefe von Testplanzen // *Arch. Phytopathol. Pflanz.* 1987. Bd 23, H. 6. S. 435-441.
- Habili N., Francki R.I.B. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic virus // *Virology*. 1975. Vol. 64, N 2. P. 421-429.
- Hagen T.J., Taylor D.B., Meagher R. Rocket immunoelectrophoresis assay for cauliflower mosaic virus // *Phytopathology*. 1982. Vol. 72. P. 239-242.
- Hahn P., Shepherd R.J. Evidence for a 58-kilodalton polypeptide as precursor of the coat protein of cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1982. Vol. 116. P. 480-488.
- Hajimarod M.R., Dietzgen R.G., Francki R.I.B. Differentiation and antigenic characterization of closely related alfalfa mosaic virus strains with monoclonal antibodies // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 12. P. 2809-2816.
- Hamilton R.I., Edwardson J.R., Francki R.I.B., Hsu H.T., Hill R., Koenig R., Milne R.G. Guide lines for the identification and characterization of plant viruses // *J. Gen. Virol.* 1981. Vol. 54, N 2. P. 223-241.
- Hammond J.H., Hull R. Plantain virus X: a new potexvirus from plantago lanceolata // *J. Gen. Virol.* 1981. Vol. 54, N 1. P. 75-90.
- Hammond J.H., Hammond R.V. Molecular cloning sequencing and expression in *Escherichia coli* of the bean yellow mosaic virus coat protein gene // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 70, N 8. P. 1961-1974.
- Hanada K., Techihara H. Some properties of an isolate of the soybean stunt strain of cucumber mosaic virus // *Phytopathology*. 1982. Vol. 72, N 7. P. 761-764.
- Hardwick N.V., Davies J.L., Wright D.M. The incidence of 3 virus diseases of winter oilseed rape in England and Wales in the 1991/92 and 1992/93 growing seasons // *Pl. Path.* 1994. Vol. 43. P. 1045-1049.
- Harker C.L., Woolston C.J., Markham P.G., Maule A.J. Cauliflower mosaic virus aphid transmission factor protein is expressed in cells infected with some aphid nontransmissible isolates // *Virology*. 1987. Vol. 160. P. 252-254.
- Hari V. The RNA of tobacco etch virus further characterization and detection of protein linked to RNA // *Virology*. 1981. Vol. 112, N 3. P. 391-399.
- Harker C.L., Woolston C.J., Markham P.G., Maule A.J. Cauliflower mosaic virus aphid transmission factor protein is expressed in cells infected with some aphid nontransmissible isolates // *Virology*. 1987. Vol. 160. P. 252-254.
- Harrison B.D. Tobacco rattle virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1970. N 12. 4 p.
- ✓ Harrison B.D. A biologist's view of twenty five years of plant virus research // *Ann. Appl. Biol.* 1980. Vol. 94, N 3. P. 321-333.
- Harrison B.D., Finch J.T., Gibbs A.J., Shepard R., Valenta V., Wetter C. Sixteen groups of plant viruses // *Virology*. 1971. Vol. 45, N 2. P. 356-363.
- Harrison B.D., Murant A.F. *Description of Plant Viruses*. Oxford: Holywell Press, 1970-1984. 80 p.

- Hart R.G. Morphological changes accompanying thermal de-naturation of tobacco mosaic virus // *Biochim. Biophys. Acta*. 1956. N 20. P. 388-389.
- Hataya T., Inoue A.K., Oshima K., Shikata F. Characterisation of strain identification of a potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific for the ordinary and necrotic strains // *Intervirology*. 1994. N 37. P. 12-19.
- Hattinga H., Mosch W.H.M. Properties of viruses of the potyviruses group // *Pl. Path.* 1974. Vol. 80, N 1. P. 19-27.
- Hayakawa T., Mizukami M., Nakajima M. et al. Complete nucleotide sequence of RNA3 from cucumber mosaic virus (CMV) strain O: comparative study of nucleotide sequence and amino acid sequence among CMV strains O, Q, D, Y // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 70, N 2. P. 499-504.
- Hayes R.J., Buck K.W. Complete replication of a eukaryotic virus RNA in vitro by a purified RNA-dependent RNA polymerase // *Cell*. 1990. Vol. 63, N 3. P. 363-368.
- Haylor M.T.M., Brunt A.A., Coutts R.H.A. Conservation of the 3'-terminal nucleotide sequence in five carlaviruses // *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18, N 20. P. 6127-6130.
- Hein A. Occurrence of watermelon mosaic virus 1 on zucchini (*Cucurbita pepo* L. var. *giromontina* Alef) in South Germany // *Phytopathol. Z.* 1977. Bd 89, H 3. S. 221-228.
- Hellwald K.H., Palucaitis P. Viral RNA as a potential target for two independent mechanisms of replicate mediated resistance against cucumber mosaic virus // *Cell*. 1995. Vol. 83, N 8. P. 937-946.
- Hemmings-Mieszczak M., Steger G., Hohn T. Regulation of CaMV 35 S RNA translation is mediated by a stable hairpin in the leader // *RNA-Publ. RNA Soc.* 1998. Vol. 4. P. 101-111.
- Hepp R.F., Converse R.H. Blueberry red ringspot virus is serologically related to cauliflower mosaic virus // *Phytopathology*. 1987. Vol. 77. P. 1229-1239.
- Herold F. Maize mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1972. N 94. 4 p.
- Heuvel J.F.J. van den, Vlugt R.F.F. van den, Verbuk M., P.T. de Haan, Huttinga H. Characteristics of a resistance-breaking isolate of potato virus Y causing potato tuber necrotic ringspot disease // *Eur. Pl. Path.* 1994. Vol. 100, N 4. P. 447-356.
- Hiebert E. et al. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y // *Virology*. 1971. Vol. 43, N 3. P. 638-846.
- Hiebert E., McDonald J.G. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y-group // *Virology*. 1973. Vol. 56, N 2. P. 349-361.
- Hiebert E., Tremaine J.H., Ronald W.P. The effect of limited proteolysis on the amino acid composition of five potyviruses and on the serological reaction and peptide maps of the tobacco etch virus capsid protein // *Phytopathology*. 1984. Vol. 70, N 4. P. 411-416.
- Hill H.J., Benner H.J. Properties of soybean mosaic virus rebonucleic acid // *Phytopathology*. 1980. Vol. 70, N 3. P. 236-239.
- Hill H.J., Benner H.J. Purification of hydrangea ringspot virus // *J. Gen. Virol.* 1977. Vol. 34, N 1. P. 115-125.
- Hill H.J., Shepard R.J. Molecular weights of plant virus coat proteins by polyacrylamide gel electrophoresis // *Virology*. 1972. Vol. 47, N 3. P. 817-822.
- Himmelbach A., Chapdelaine J., Hohn T. Interaction between cauliflower mosaic virus inclusion body protein and capsid protein: implications for viral assembly // *Virology*. 1996. Vol. 217. P. 147-157.
- Hitachi J., Wakimoto S. An improved method for purification of soybean mosaic virus // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1985. N 51. Vol. 39, N 5. P. 314-315.
- Hiskias Y., Lesemann D.E., Vetten H.J. Occurrence, distribution and relative importance of viruses infecting hot pepper and tomato in the major growing areas of Ethiopia // *Phytopathology*. 1999. Vol. 147, N 1. P. 5-11.
- Hodgson R.A.J., Beachy R.N., Pakrasi H.B. Selective inhibition of photosystem II in spinach by tobacco mosaic virus: an effect of the viral coat protein // *FEBS*. 1989. Vol. 245, N 1/2. P. 267-270.
- Hohn T., Richards K., Lebourier G. Cauliflower mosaic virus on its way to becoming a useful plant vector // *Current Topics in Microbiol., Immunol.* 1982. Vol. 96. P. 193-236.



- Hollings V.* Investigation of chrisantemums viruses. I. Aspermy flower distaction // *Ann. Appl. Biol.* 1955. Vol. 53, N 1. P. 86–102.
- ✦ *Hollings M., Stone O.M.* The long-term survival of some plant viruses preserved by liophilization // *Ann. Appl. Biol.* 1970. Vol. 65, N 3. P. 411–418.
- Hollings M., Stone O.M.* Tomato aspermy virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1971. N 79. 4 p.
- Hollings M., Komuro Y., Mitsuhashi K.* Cucumber green mottle mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1975. N 154. 4 p.
- Hollings M., Huttinga H.* Tobacco mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1976. N 156. 4 p.
- Hollings M., Brunt A.A.* Potyvirus group // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1981. N 245. 4 p.
- Holmes F.O.* Cytological study of the intracellular body characteristic of Hippeastrum mosaic // *Bot. Gaz.* 1928. Vol. 86, N 1. P. 50–57.
- Holmes F.O.* Symptoms of tobacco mosaic disease // *Contribs B. Thompson Inst. Pl. Res.* 1932. Vol. 4. P. 323–357.
- Holmes F.O.* A masked strain of the tobacco mosaic virus // *Phytopathology.* 1934. Vol. 24, N 8. P. 845–873.
- Holmes F.O.* Handbook of phytopatogenic virus. Minneapolis (Minnesota): Burgess, 1939. 221 p.
- Holmes F.O.* A distinctive strain of tobacco mosaic virus from Plantago // *Phytopathology.* 1941. Vol. 31, N 12. P. 1089–1098.
- Holmes F.O.* A comparison of the experimental host ranges of tobacco-etch and tobacco-mosaic virus // *Phytopathology.* 1946. Vol. 36, N 8. P. 643–407.
- Horvath J.* New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses. IV. Tobamovirus group: tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1978. Vol. 13, N 1/2. P. 57–73.
- Horvath J.* New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses. X. Cucumovirus group: cucumber mosaic virus // *Acta Phytopathol.* 1979 a. Vol. 14, N 3/4. P. 285–295.
- Horvath J.* New artificial hosts and non-hosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses. IX. Potyvirus group (subdivision-III): potato virus Y, turnip mosaic virus and watermelon mosaic virus (strain 2 or general strain) // *Acta Phytopathol.* 1979 b. Vol. 14, N 1/2. P. 157–173.
- Horvath J.* The role of some plants in the ecology of cucumber mosaic virus with special regard to bean // *Acta Phytopathol.* 1983. Vol. 18, N 4. P. 217–224.
- Horvath J., Besada W.H., Juretic N., Mamula D.* Some data on properties of cauliflower mosaic virus in Hungary // *Tag. Ber. Akad. Landwirtsch. Wiss. DDR.* 1980. Bd 184. S. 53–60.
- Horvath J., Besada W.H., Juretic N.* et al. Two viruses isolated from patisson (*Cucurbita pepo* L. var. *patissonina* Greb. *F. radiata* Nois), a new vegetable natural host in Hungary. II. Cucumber mosaic virus // *Tag. Ber. Akad. Landwirtsch.* 1975 a. Vol. 10, N 3/4. P. 257–267.
- Horvath J., Juretic N., Besada W.H., Kuroli G.* Two viruses isolated from patisson (*Cucurbita pepo* L. var. *patissonina* Greb. *F. radiata* Nois), a new vegetable natural host in Hungary. I. Watermelon mosaic virus (general) // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1975 b. Vol. 10, N 1/2. P. 93–112.
- Howarth A., Gargner R., Messing J., Shepherd R.* Nucleotide sequence of naturally occurring deletion mutants of cauliflower mosaic virus // *Virology.* 1981. Vol. 112. P. 678–685.
- Howell S.H., Hull R.* Expression of virus genome in plant protoplast infected with cauliflower mosaic virus and its DNA // *Pl. Physiol.* 1977. Vol. 59. P. 105–106.
- Howell S.H., Hull R.* Replication of cauliflower mosaic virus and transcription of its genome in Turnip leaf protoplasts // *Virology.* 1978. Vol. 86. P. 468–481.
- Hsu H.T., Barzuna L., Hsu Y.H.* et al. Identification and subgrouping of cucumber mosaic virus with mouse monoclonal antibodies // *Phytopathology.* 2000. Vol. 90, N 6. P. 615–620.
- Huet H., Gal-On A., Meir E., Lecoq H., Raccach B.* Mutations in the helper component-proteinase gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility // *J. Gen. Virol.* 1994. Vol. 75, N 6. P. 1407–1414.

- Hull R. Alfalfa mosaic virus // *Adv. Virus Res.* 1969. Vol. 15. P. 365-438.
- Hull R. The multicomponent nature of broad bean mottle virus and its nuclei acid // *Adv. Virus Res.* 1972. Vol. 17, N 1. P. 111-117.
- Hull R. Structure of cauliflower mosaic virus genome III. Restriction endonuclease mapping of thirty-three isolates // *Virology.* 1980. Vol. 100. P. 76-90.
- Hull R., Covey S. Structure and replication of caulimovirus genomes // *J. Cell Sci.* 1987. Vol. 7. P. 213-229.
- Hull R., Shepherd R.J., Harvey J.D. Cauliflower mosaic virus: an improved purification procedure and some properties of the virus particles // *J. Gen. Virol.* 1976. Vol. 31. P. 93-100.
- Hull R., Shepherd R.J. The coat proteins of cauliflower mosaic virus // *Virology.* 1976. Vol. 70. P. 217-220.
- Hull R., Howell S.H. Structure of the cauliflower mosaic virus genome. II. Variation in DNA structure and sequence between isolates // *Virology.* 1978. Vol. 86. P. 482-493.
- Hunst P.L., Tolin S.A. Isolation and comparison of two strains of soybean mosaic virus // *Phytopathology.* 1982. Vol. 72, N 7. P. 710-713.
- Hunst P.L., Tolin S.A. Isolation and comparison of barley yellow dwarf virus // *Phytopathology.* 1985. Vol. 75, N 8. P. 914-919.
- Hussain M., Melcher U., Essenberg R. Infection of vacuolated turnip protoplasts with liposome-packaged cauliflower mosaic virus // *Pl. Cell Rep.* 1985. Vol. 4. P. 58-62.
- Huttinga Y., Mosch E. Properties of virus of the potyviruses group // *Pl. Pathol.* 1974. Vol. 80, N 1. P. 19-27.
- Huttinga Y., Rust A.Th B. Tomato mosaic tobamovirus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1985. P. 1302-1304.
- Igwegbe E. Some properties of a tobacco mosaic virus strain isolated from pepper (*Capsicum annum*) in Nigeria // *Pl. Dis.* 1983. Vol. 67, N 3. P. 317-320.
- Iida T.T. Dwarf yellow, stripe and black-streaked dwarf disease of rice // *The virus diseases of the rice plant.* Baltimore, 1969. P. 3-11.
- Ito S., Fukushito T. Studies on northern cereal mosaic // *J. Sapporo Soc. Agr. Forestry.* 1944. Vol. 36, N 3. P. 62-89.
- Iwaki H. Viruses causing mosaic diseases of Amaryllis in Japan // *Ann. Phytopatol. Soc. Japan.* 1967. Vol. 33, N 4. P. 237-239.
- Iwaki H., Wakimoto S. An improved method for purification of soybean mosaic virus // *Ann. Phytopatol. Soc.* 1985. Vol. 51, N 4. P. 465-473.
- Jacquot E., Geldreich A., Keller M., Yot P. Mapping regions of the cauliflower mosaic virus ORF III product required for infectivity // *Virology.* 1998. Vol. 242. P. 395-402.
- Jain R.K., Pappu H.R., Pappu S.S. et al. Molecular characterization of papaya ringspot potyvirus isolates from India // *Ann. Appl. Biol.* 1998. Vol. 132, N 3. P. 413-425.
- Jakab G., Droz E., Brigneti G., Baulcombe D. Infectious in vitro transcripts from a full length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y // *J. Gen. Virol.* 1997. Vol. 78. P. 3141-3145.
- Jockson A.O., Chrisite A. Purification of some physicochemical properties of sonchus yellow net virus // *Virology.* 1977. Vol. 77, N 3. P. 344-355.
- Johnson J. The classification of plant virus // *Wisconsin. Univ. Agr. Exp. Stat. Res. Bull.* 1927. Vol. 76. P. 1-16.
- Johnson J. Virus diseases of tobacco in Kentucky // *Kentucky Agr. Exp. Stat. Res. Bull.* 1930. Vol. 306. P. 289-415.
- Johnson J., Hoggan I.A. A descriptive key for plant virus // *Phytopathology.* 1935. Vol. 25, N 4. P. 328-343.
- Jones R.T., Diachum S. Serologically and biologically distinct bean yellow mosaic virus strains // *Phytopathology.* 1977. Vol. 67, N 7. P. 831-838.



- Jones A.S., Koenig R., Lesemann D.E.* Pepino mosaic virus – a new potexvirus from pepino (*Solanum muricatum*) // *Ann. Appl. Biol.* 1980. Vol. 94, N 1. P. 61–68.
- Jones R.A., Fuller N.J.* Incidence of potato virus V in potato stocks in England and Wales // *Pl. Path.* 1984. Vol. 33, N 4. P. 595–597.
- Kado C.I., Van Regenmortel M.H.V., Knight C.A.* Studies on some strains of tobacco mosaic virus in orchids. I. Biological, chemical and serological studies // *Virology.* 1968. Vol. 34, N 1. P. 17–24.
- Kaczmarek U., Mosakowska E.* Interaction between strains of the potato virus Y (PVY<sup>o</sup>, PVYN-type Wilga, PVY<sup>NTN</sup>) and the potato plants two cultivars // *The 11-th EAPR Virology Section Meeting, Havlickuv Brod-Trest, 2001.* P. 18–19.
- Kameya-Iwaki M.* Cucumber mosaic virus (*Cucumovirus*) // *Plant viruses in Asia / eds Murayama D. et al.* Gadjah Mada: Univ. Press Yogyakarta, 1998. P. 548–550.
- Kanyuka K.V., Vishnichenko V.K., Levay K.E., Konrtkov D.Y., Ryabov E.V., Zavriev S.K.* Nucleotide sequence of *Shalot virus* X RNA reveals a 5'-proximal cistron closely related to those of potexviruses and a unique arrangement of the 3'-proximal cistron // *J. Gen. Virol.* 1992. Vol. 73. P. 2553–2560.
- Kaper J.M., Re G.G.* Reexamination of the RNA content and the limiting RNA size of three strains of cucumber mosaic virus // *Virology.* 1974. Vol. 60, N 1. P. 308–311.
- Kaper J.M., Tousignant M.E.* Cucumber mosaic virus-associated RNA5. I. Role of host plant and helper strain in determining amount of associated RNA5 with virions // *Virology.* 1977. Vol. 80, N 1. P. 186–195.
- Kaper J.M., Tousignant M.E., Steen M.T.* Cucumber mosaic virus-associated RNA5: XL comparison of 14 CARNA5 variants relates ability to induce tomato necrosis to a conserved nucleotide sequence // *Virology.* 1988. Vol. 163, N 2. P. 284–292.
- Kaper J.M., Waterworth H.E.* Cucumber mosaic virus associated RNA5: causal agent for tomato necrosis // *Science.* 1977. Vol. 196, N 4288. P. 429–431.
- Kaper J.M., Waterworth H.E.* *Cucumoviruses. Handbook of plant viruses infections: Comparative diagnosis* Elsevier. North. Holland, Amsterdam. 1981. 412 p.
- Kaplan I.B., Gal-On A., Palukaitis P.* Characterization of cucumber mosaic virus. III. Localization of sequences in the movement protein controlling systemic infection in cucurbits // *Cucumoviruses. Handbook of plant viruses infections: Comparative diagnosis* Elsevier. North. Holland, Amsterdam. 1997. Vol. 230, N 2. P. 343–349.
- Kaplan I.B., Zhang L., Palukaitis P.* Characterization of cucumber mosaic virus. V. Cell-to-cell movement requires capsid protein but not virions // *Cucumoviruses. Handbook of plant viruses infections: Comparative diagnosis* Elsevier. North. Holland, Amsterdam. 1998. Vol. 246, N 2. P. 221–231.
- Karam N., Al-Musa A.* Purification and characterization of a Jordanian isolate of watermelon mosaic virus // *Phytopathol. Z.* 1984. Bd 111, H. 2. S. 114–122.
- Karsies A., Merkle T., Szurek B. et al.* Regulated nuclear targeting of cauliflower mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 2002. Vol. 83. P. 1783–1790.
- Kassanis B.* A necrotic disease of forced tulips, caused by tobacco necrosis virus // *Ann. Appl. Biol.* 1949. Vol. 36, N 1. P. 14–17.
- Kassanis B.* Tobacco necrosis virus // *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses.* 1970. N 14. 4 p.
- Kassanis B., Phillips U.P.* Serological relationship of strain of tobacco necrosis virus and their ability to activate strains of satellite virus // *J. Gen. Virol.* 1970. Vol. 9, N 1. P. 119–124.
- Kassanis B., Govier D.A.* Potato aucuba mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1972. N 98. 4 p.
- Kassanis B., White R., Woods R.D.* Genetic complementation between middle and bottom component of two strains of radish mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1973. Vol. 20, N 3. P. 247–285.
- Kasschau K.D., Cronin S., Carrington J.C.* Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase // *Virology.* 1997. Vol. 228, N 2. P. 251–262.
- Kasteel D.T., Perbal M.C., Boyer J.C. et al.* The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells // *J. Gen. Virol.* 1996. Vol. 77. P. 2857–2864.

- Kearney C.M., Gonsalves D., Provvidenti R. A severe strain of cucumber mosaic virus from China and its associated satellite RNA // *Plant. Dis.* 1990. Vol. 74, N 10. P. 819–823.
- Keinonen-Mettala K., Papinen A., Weissenberg K. Comparisons of the efficiency of some promoters in silver birch (*Betula pendula*) // *Pl. Cell Rep.* 1998. Vol. 17. P. 356–361.
- Kelly D.C., Cooper J., Walker D.G.A. Cauliflower mosaic virus proteins // *Microbiol.* 1974. Vol. 10. P. 239–245.
- Kennedy J.S., Day M.F., Eastop V.F. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses // *Commonw. Inst. Entomology. England.* 1962. 41 p.
- Khadhair A.H., Sinha R.C. Characteristics of isolate of white clover mosaic virus prevalent in Eastern Ontario // *Can. Pl. Des. Surv.* 1982. Vol. 62, N 1. P. 3–7.
- Kiraly L., Cole A., Bourque J., Schoelz J. Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana clevelandii* and gene VI of cauliflower mosaic virus // *Mol. Pl. Microbe Interactions.* 1999. Vol. 12. P. 919–925.
- Kiryama K. Preparation of mouse ascitic antibody against tobacco stunt disease antigen and its application for serodiagnosis // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 1975. Vol. 41, N 3. P. 373–377.
- Kiryama K., Oshumi H. Antibody production in tumorous ascites of mice infected with plant viruses // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* 1973. Vol. 39, N 4. P. 318–324.
- Kiss E., Lovai Z., Suranyi R., Gombos J. The effect of ecological factors on the virus infection of pepper // *Proc. Inter. Conf. Integr. Pl. Protec.* 1983. Vol. 3. P. 58–64.
- Kiss-Laszlo Z., Blanc S., Hohn T. Splicing of cauliflower mosaic virus 35S RNA is essential for viral infectivity // *EMBO J.* 1995. Vol. 14. P. 3552–3562.
- Kleinhampel H. Mechanisch Übertragbare Viren an Johannis – und Stachelbeere in der Deutschen Demokratischen Republik // *Zbl. Bacteriol. Parasitenk. Infektion. Hyg. Abt. 2.* 1971. Bd 126, H. 1 S. 93–109.
- Klinkowski M. Pflanzliche virology. Berlin.: Akad. Verlag, 1968. Bd 2. S.1–460.
- Klinkowski M. Das Tabakatzmosaic // *Pflanzliche Virologie.* Berlin: Acad. Verlag, 1977. Bd 11. S. 305–307.
- Klinkowski M., Kegler H. Virus krankheiten der Kartoffel // *Die Kartoffel.* Dresden: VEB, 1962. Bd I. S. 1025–1138.
- Kobayashi K., Nakayashiki H., Tsuge S., Mise K., Furusawa I. Accumulation kinetics of viral gene products in cauliflower mosaic virus-infected turnip protoplasts // *Microbiol., Immunol.* 1998. Vol. 42. P. 65–69.
- Kobayashi K., Tsuge S., Nakayashiki H., Mise K., Furusawa I. Requirement of cauliflower mosaic virus open reading frame VI product for viral gene expression and multiplication in turnip protoplasts // *Microbiol., Immunol.* 1998. Vol. 42. P. 377–386.
- Kobyko T., May Z. Identyfikacja wirusa mozaiki rzepy (Turnip mosaic virus) wyizolowana nego z brukwi (*Brassica rapabrossica* L.) // *Acta Agr. Silv. Ser. agr.* 1989. N 28. P. 19–23.
- Koenig R. Hydrangea ringspot virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1973. N 114. 3 p.
- Koenig R. ELISA in the stude of homologous and heterologous reactions of plant viruses // *J. Gen. Virol.* 1978. Vol. 40, N 2. P. 309–318.
- Koenig R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses // *J. Virol.* 1981. Vol. 55, N 1. P. 53–62.
- Koenig R., Lesemann D.E. Potexvirus group // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1978. N 200. 4 p.
- Koot J. Van., Derst J.H.M. Van. Virus disease of cucumbers in the Netherlands // *Tiidschr. Plantenz.* 1959. Vol. 65. P. 257–278.
- Koshimizu Y., Iizuka N. Studies on soybean virus diseases in Japan // *Bull. Tohoku Nat. Agr. Exp. Stn.* 1963. Vol. 27, N 1. P. 1–103.
- Kozlov L.P., Yakutkina T.A., Sozonov A.N. The occurence and strain structure of potato virus Y in NW Russia // *Pushkin*, 2003. P. 26–27.



- Kristensen H.B., Thansen A.* Chrysanthemum - viruses // Tidsskr. hlanteavl. 1958. Vol. 62, N 4. P. 627-669.
- Kruse J., Timmins P., Witz J.* The spherically averaged structure of a DNA isometric plant virus - cauliflower mosaic virus // Virology. 1987. Vol. 159. P. 166-168.
- Kuan Ch.-P., Chen K.-H., Su H.Y.* Serological characterization of papaya ringspot virus isolates in Taiwan // Bot. Bull. Acad. Sci. 1999. Vol. 40, N 1. P. 231-236.
- Kunkel L.O.* Amoeboid bodies associated with Hippeastrum mosaic // Science. 1922. Vol. 55, N 1. P. 73.
- Kuwite C.A., Purcifull D.E.* Some properties of a cucumber mosaic virus strain isolated from winged bean in Florida // Plant Dis. 1982. Vol. 66, N 11. P. 1071-1073.
- Laemmli U.K.* Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. Lond. 1970. Vol. 227, N 5. P. 680-685.
- Lain S., Martin M.T., Ricchmann J.L., Garcia J.A.* Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATP-ase activity of the plum pox potyvirus helicase protein // J. Virol. 1991. Vol. 65, N 1. P. 1-16.
- Lana A., Agrios G.N.* Properties of a strain of tobacco mosaic virus isolated from white ash trees // Phytopathology. 1974. Vol. 64, N 12. P. 1490-1495.
- Lane L.C.* Brome mosaic virus // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1977. N 11. 4 p.
- Lane L.C.* Brome mosaic virus group // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1979. N 13. 4 p.
- Lane L.C.* Bromovirus group // Plant Virus Infections and Compatative Diagnosis /ed E. Kurstak. Elsevier. North. Holland, Amsterdam. 1981. P. 333-376.
- Lastra R.* Occurrence of cucurbit viruses in Venezuela // Pl. Dis. Repr. 1968. Vol. 52, N 2. P. 171-174.
- Lawson R.H.* Oakleaf chlorosis symptomatic of cucumber mosaic virus infection in dahlia // Phytopathology. 1966. Vol. 56, N 3. P. 343-344.
- Lawson R.H., Brannigan M.* Virus diseases of orchid Pests and Deseases. Futrican Orchid Sosity. West Plant Weach. 1986. 49 p.
- Lebeurier G., Hirph V., Hohn T., Hohn B.* Infectivities of native and cloned DNA of cauliflower mosaic virus // Gene. 1980. Vol. 12. P. 139-146.
- Leclerc D., Chadelaine Y., Hohn T.* Nuclear targeting of the cauliflower mosaic virus coat protein // Virology. 1999. Vol. 73. P. 553-560.
- Lecoq H., Lot H., Pitrot M.* First identification of watermelon mosaic virus type 1 (WMV1) in southwestern France // Agronomie. 1982. Vol. 2. N 8. P. 787.
- Lee S.* Rice stripe disease in Korea // The virus diseases of the rice plant. Baltimore, 1969. P. 67-73.
- Leeuw G.T.N.* Tobacco mosaic virus in Hippeastrum hybridum // Neth. J. Pl. Path. 1972 a. Vol. 78, N 2. P. 69-71.
- Leeuw G.T.N.* Hyoscyamus niger a useful local lesion host for a mosaic virus in Hippeastrum // Neth. J. Pl. Path. 1972 b. Vol. 78, N 2. P. 107-115.
- Leh V., Jacquot E., Geldreich A. et al.* Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein // EMBO J. 1999. Vol. 18. P. 7077-7085.
- Leh V., Yot P., Keller M.* The cauliflower mosaic virus translational transactivator interacts with the 60S ribosomal subunit protein L18 of Arabidopsis thaliana // Virology. 2000. Vol. 266, N 1. P. 1-7.
- Leonard D.A., Zaitlin M.* A temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus defective in cell-to-cell movement generates an altered // Virology. 1982. Vol. 117, N 2. P. 416-424.
- Lesemann D.E., Koenig R., Hein L.* Static virus Y-a virus related to bean yellow mosaic and clover yellow vein viruses // Phytopathol. Z. 1979. Bd 90, H. 2. S. 128-139.
- Lesnaw J.A., Reichmann M.E.* The structure of tobacco necrosis virus // Virology. 1969. Vol. 39, N 1. P. 729-737.
- Le Romancer M., Kerlan C., Nedelilec M.* Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superticial necrosis on potato tuder // Potato Plant Pathol. 1944. Vol. 43. P. 138-144.

- Lewandowski D.J.* A single mutation in the tobacco mosaic virus 126/183 kDa proteins eliminates symptom production // *Phytopathology*. 1994. Vol. 84, N 8. P. 869.
- Liang Ji.* Cauliflower mosaic virus (Caulimovirus) // *Plant viruses in Asia*. Gadjah Mada: Univ. Press. Yogyakarta, 1998. P. 51–53.
- Liang Ji.* Northern cereal mosaic virus (Citorhabdovirus) // *Plant viruses in Asia*. Gadjah Mada: Univ. Press. Yogyakarta, 1998. P. 78–83.
- Liang Ji.* Tobacco etch virus (Potyvirus) // *Plant viruses in Asia*. Gadjah Mada: Univ. Press. Yogyakarta, 1998. P. 157–159.
- Liljas Li., Unge T., Jones A. et al.* Structure of satellite tobacco necrosis virus at 30 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1982. N 1. P. 93–108.
- Lin R., Ruan Y., Jin S.* Serological detection of wheat rosette stunt virus (WRSV) // *Sci. Agr. Sin.* 1983. Vol. 9. P. 64–79.
- Lin H.S., Rubio L., Smythe A. et al.* Genetic diversity and biological variation among California isolates of cucumber mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 2003. Vol. 84. P. 249–258.
- Lindberg G.D., Hall D.H., Walker J.C.* A study of melon and squash mosaic viruses // *Phytopathology*. 1956. Vol. 46, N 9. P. 489–495.
- Lisa V., Boccardo G., D'Agostino G. et al.* Characterization of a potyvirus that causes zucchini yellow mosaic // *Phytopathology*. 1981. Vol. 71, N 5. P. 668–672.
- Lisa V., Lovisolo O.* Biological and serological characterization of the Alliaris strain of the turnip mosaic virus // *Phytopathol. Z.* 1976. Bd 86, H 1. S. 90–96.
- Lister R.M., Ranieri R.* Distribution and economic importance of barley yellow dwarf // *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress* / eds. C.J. D'Arcy, P.F. Burnett. APS Press. St. Paul. MN. 1995. P. 29–53.
- Lobert S., Stubbs G.* X-ray diffraction analysis of cucumber green mottle mosaic virus using limited numbers of heavy-atom derivatives // *Acta crystallogr.* 1990. Vol. 46, N 12. P. 993–997.
- Lochart B.E., Betzold J.A., Pfliger F.Z.* Characterisation of a potyvirus causing a leaf distortion disease of *Tradescantia* and *Zebrina* species // *Phytopathology*. 1981. Vol. 71, N 6. P. 602–604.
- Loebenstein G.* Localization and induced resistance in virus-infected plants // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1972. Vol. 10. P. 177–206.
- Lorensen J.H., Piche L.M., Gudmestad N., Meacham N., Shiel P.* A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixture // *Plant. Dis.* 2006. Vol. 90. P. 935–940.
- Lorensen J.H., Meacham N., Berger P.H., Shiel P., Closslin J.V., Hamm P.B., Kopp H.* Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected from the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada // *Arch. Virol.* (in press). 2006.
- Lot H., Kaper J.M.* Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus and peanut stunt virus // *Virology*. 1976. Vol. 74, N 1. P. 209–222.
- Lot H., Marchoux Z., Marrou J., Kaper J.M., West C.K., Vanvloten L., Hull R.* Contribution a l'etude de virus de la mosaïque du concombre (CMV). I. Methode de purification rapide du virus // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1972. Vol. 4, N 5. P. 735–740.
- Lovisolo O.* Viruses diseases of Cucurbitaceae in the Mediterranean region // *J. Phytiatric, Phytopharmacie Circum-Medit.* Rabat (Maroc). 1972. P. 1–13.
- Lung M.S., Pirone T.P.* Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus-isolates by aphids // *Phytopathology*. 1973. Vol. 63. P. 910–914.
- Lung M.S., Pirone T.P.* Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1974. Vol. 60. P. 260–264.
- MacNeill B.H.* A specialized tomato form of the tobacco mosaic virus in Canada // *Can. J. Bot.* 1962. Vol. 40, N 1. P. 1603–1604.
- Maiti I., Shepherd R.* Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FL-t) promoter in transgenic plants // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. Vol. 244. P. 440–444.



- Makkouk K.K., Lesemann D.E., Haddad W.A.* Bean yellow mosaic virus from broad bean in Lebanon: incidence, host range, purification, and serological properties // *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*. 1982. Bd 89, H 1/2. S. 59–62.
- Mamaev P.Y.* Comparison of cereal mosaic virus with rhabdoviruses from China and Japan // *Abst. 6-th Conf. «Virus diseases of Gramineae in Europe»*. Torino, Italy. 1991. P. 7.
- Mansour A., Al-Musa A.* Incidence, economic importance and prevention of watermelon mosaic virus-2 in squash (*Cucurbita pepo*) fields in Jordan // *Phytopathol. Z.* 1982. Bd 103, H 1. S. 35–40.
- Markham R., Hitchborn J.H., Hills G.J., Frey S.* The anatomy of tobacco mosaic virus // *Virology*. 1964. N 22. P. 342–359.
- Markham P.G., Pinner M.S., Raccach B., Hull R.* The acquisition of caulimovirus by different aphid species // *Ann. Appl. Biol.* 1987. N 111. P. 571–587.
- Marrou J., Quiot J.B., Marchoux G.* et al. Characterization par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaïque du concombre et de deux autres cucumovirus: tentative de classification // *Meded. Fac. Landbouwwetensch. Rijksuniv. Gent*. 1975. Vol. 40, N 1. P. 107–117.
- Marsh L., Kuzj A.* Identification and characterization of cauliflower mosaic virus replication complexes – analogy to hepatitis-B viruses // *Virology*. 1985. Vol. 143. P. 212–223.
- Martelli G.P., Castellano M.A.* Light and electron microscopy of the intracellular inclusions of cauliflower mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1971. Vol. 13. P. 133–140.
- Martelli G.P., Russo M.* Electron microscopy of Frtichoke Mottled Crinkle Virus in Leaves of *Chenopodium quinoa* Willd. // *J. Ultrastruct. Res.* 1973. Vol. 42, N 1. P. 93–107.
- Martelli G.P., Russo M.* Unusual cytoplasmic inclusions induced by watermelon mosaic virus // *Virology*. 1976. Vol. 72, N 2. P. 352–362.
- Martinez-Izquierdo J.A., Futterer J., Hohn I.* Protein encoded by ORF I of cauliflower mosaic virus is part of the viral inclusion body // *Virology*. 1987. Vol. 160. P. 527–530.
- Mathwes A., Dwyer G., Wylie B., Jones M.S.* Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 3' and the BYMV-MI genome // *Arch. Virol.* 1995. Bd 140, H. 12. S. 2269–2272.
- Mathews R.E.F.* Classification and nomenclature of viruses: third report of the international committee on taxonomy of viruses // *Intervirology*. 1979. Vol. 12, N 2/4. P. 132–296.
- Mathews R.E.F.* *Plant virology*. 2-nd ed. N. Y.; L.; Toronto; Sydney; San Francisco: Acad. Press, 1981. 897 p.
- Mathews R.E.F.* Classification and nomenclature of viruses: fourth report of the international committee on taxonomy of viruses // *Intervirology*. 1982. Vol. 17, N 1/3. P. 1–199.
- Mathews R.E.F.* *Carlavirus group* // *Plant Virology*. 3-d Ed., Academic Press. 1991. N 4.
- Maule A.J.* Infection of protoplasts from several Brassica species with cauliflower mosaic virus following inoculation using polyethylene-glycol // *J. Gen. Virol.* 1983. Vol. 64. P. 2655–2660.
- Maule A.J., Harker C.L., Wilson I.G.* The pattern of accumulation of cauliflower mosaic virus-specific products in infected turnips // *Virology*. 1989. Vol. 169. P. 436–446.
- Mayo M.A.* Developments in plant viruses taxonomy since the publication of the 6-th ICTV Report // *Arch. Virol.* 1999. Bd 144, H. 8. S. 1659–1666.
- Mayo M.A., Pringle C.R.* Virus taxonomy-1997 // *J. Gen. Virol.* 1998. Vol. 79, N 6. P. 649–657.
- McDaniel L.L., Maratos M.L., Goodman J.E., Tolin S.A.* Partial characterization of soybean strain of tobacco mosaic virus // *Plant Dis.* 1995. Vol. 79, N 2. P. 206–211.
- McKinney H.H.* Studies on the virus of bromegrass mosaic // *Phytopathology*. 1944. Vol. 34, N 11. P. 993.
- Meagner R., Shepherd R., Boyer H.* A Restriction endonuclease map of cauliflower mosaic virus DNA // *Virology*. 1977. Vol. 80. P. 362–375.
- Meer van der F.W., Garnett H.M.* Purification and identification of South African isolate of watermelon mosaic virus – Morocco // *Phytopathol. Z.* 1987. Bd 120, H. 3. S. 255–270.
- Mejia M.V.G., Hiebert E., Purcifull D.E.* et al. Identification of potyviral amorphous inclusion as a nonstructural virus-specific protein related to helper component // *Virology*. 1985 a. Vol. 142, N 1. P. 34–43.

- Mejia M.V.G., Hiebert E., Purcifull D.E.* Isolation and partial characterization of the amorphous cytoplasmic inclusions associated with infections caused by two potyviruses // *Virology*. 1985 b. Vol. 142, N 1. P. 24–33.
- Melcher U.* Symptoms of cauliflower mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana* and turnip // *Botanical gazette*. 1989. Vol. 150, N 2. P. 139–147.
- Melcher U., Choe I., Lebeurier G.* et al. Selective allele loss and interference between cauliflower mosaic virus DNAs // *Mol. Gen. Genet.* 1986. Vol. 203. P. 230–236.
- Melcher U., Hein R., Gardner C.* et al. An indirect radioimmunoassay of cauliflower mosaic virus // *Phytopathology*. 1980. Vol. 70. P. 954–957.
- Melnichuk M.D., Dubin A.V., Spyrydonov V.G., Melnychuk S.D.* Detection and identification of the transgenes in the genetically modified plants on the example of Bt-potatp // *Microbiol. J.* 2002. Vol. 64, N 1. P. 26–32.
- Menissier J., Hunting D.J., Murcia G.* Electron microscopic mapping of single-stranded discontinuities in cauliflower mosaic virus DNA by means of the biotin-avidin technique // *Anal. Biochemistry*. 1985. Vol. 148. P. 339–343.
- Meroni F.* Il virus delliaspermian del chricantemo (CAV) // *Phytopathol. Meditarr.* 1969. Vol. 8, N 2. P. 142–149.
- Mesnard J., Mougeot J., Geldreich A., Lebeurier G.* Characterization of different electrophoretic forms of cauliflower mosaic virus virions (strain Cabb-S) // *Biochimie*. 1993. Vol. 75. P. 645–649.
- Mével S., Kerlan C.* Biological properties of different isolates of cauliflower mosaic virus. 1. Solanaceous hosts // *Agronomie*. 1990. Vol. 10. P. 749–752.
- Migliory A., Lastra R.* Etude de virus present chez *Commelina diffusa* Burm. on guadeloupe // *Ann. Phytopathol.* 1978. Vol. 16, N 6. P. 467–477.
- Migliory A., Lastra R.* Characterization dun virus de *Commelina diffusa* (CDV) // *Ann. Phytopathol.* 1980. Vol. 12, N 3. P. 145–151.
- Milne K.S., Grogan R.G.* Characterization of watermelon mosaic virus strains by serology and other properties // *Phytopathology*. 1969. Vol. 39, N 6. P. 805–818.
- Miki T., Knight C.A.* Some chemical studies on a strain of white clover mosaic virus // *Virology*. 1967. Vol. 31, N 1. P. 55–63.
- Miki T., Oshima N.* Chemical studies of the structural protein of potato aucuba mosaic virus // *Virology*. 1972. Vol. 48, N 2. P. 386–393.
- Mink G.I., Iizuka N., Kiriyama K.* Some cucumber mosaic virus antisera contain antibodies specific for both peanut stunt virus and chrysanthemum mild mottle virus // *Phytopathology*. 1975. Vol. 65, N 1. P. 65–68.
- Mochamed W.A., Young B.R.* Garlic yellow streak virus, a potyvirus infecting garlic in New Zeland // *Ann. Appl. Biol.* 1984. Vol. 97, N 1. P. 65–75.
- Moghal S.M., Francki R.I.B.* Towards a system for the identification and classification on potyviruses. I. Serology and amino acid composition of six distinct viruses // *Virology*. 1976. Vol. 73, N 2. P. 350–362.
- Moghal S.M., Francki R.I.B.* Towards a system for the identification and classification on potyviruses. II. Virus particle length, symptomatology and cytopathology of six distinct viruses // *Virology*. 1981. Vol. 112, N 1. P. 210–216.
- Mokra V.* Contribution on the identification of viruses necrosis found on *Primula obdonica* Hance in Czechoslovakia // *Rostlinna vyroba. Praha*. 1960. Sbor. CSAZV-Rost. Vir. 6/8. P. 1175–1190.
- Mokra V., Cech M., Pozdena J., Break J.* Tulip necrosis caused by tobacco mosaic virus // *Phytopathol. Z.* 1973. Bd 76, H. 1. S. 46–56.
- Montasser M.S., Tousignant E., Kaper J.M.* Satellite-mediated protection of tomato against cucumber mosaic virus: I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field // *Plant Dis.* 1991. Vol. 75, N 1. P. 86–92.
- Moorman G.W.* Cucumber mosaic virus disease-induced crystalline inclusion appearance, enlargement, and dispersal in sweet peppers // *Phytopathology*. 1975. Vol. 72, N 7. P. 939.



- Moorman G.W., Woodbridge W.C.* Morphogenesis of cucumber mosaic virus-induced crystalline inclusions in pepper // *Phytopathology*. 1983. Vol. 73, N 8. P. 1106–1108.
- Morales F.J., Lettler F.W.* Characterization and electron microscopy of a potyvirus infecting *Commelina diffusa* // *Phytopathology*. 1977. Vol. 67, N 7. P. 839–843.
- Morales F.J., Bos L.* Bean common mosaic virus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1988. N 73(337). 6 p.
- Morris T.J., Mullian R.H., Schlegel D.E.* et al. Isolation of caulimovirus from strawberry tissue infected with strawberry vein banding virus // *Phytopathology*. 1980. Vol. 70. P. 156–160.
- Mossop D.W., Francki R.F.B.* Association of RNA3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus // *Virology*. 1977. Vol. 81, N 1. P. 177–181.
- Mowat W.P.* Pathology and properties of tulip virus X, a new potexvirus // *Ann. Appl. Biol.* 1982. Vol. 101, N 1. P. 51–63.
- Mougeot J., Guidasch T., Wurch T.* et al. Identification of C-terminal amino acid residues of cauliflower mosaic virus open reading frame III protein responsible for its DNA binding activity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 1470–1473.
- Mraz I., Petzik K., Franova-Honetslegrova J.* Detection of strawberry vein banding virus by polymerase chain reaction and dot blot hybridization // *Acta Virologica*. 1997. Vol. 41. P. 241–242.
- Msnard J., Carriere C.* Comparison of packaging strategy in Retroviruses and Pararetroviruses // *Virology*. 1995. Vol. 213. P. 1–6.
- Munoz J.O., Docampo D.M.* Incidencia del enanismo amarillo de lacedolla (Onion Dwarf Yellow Virus) en la produccion de bullos // *IDEA*. 1975. N 325/327. C. 7–9. (На исп. яз.)
- Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. P. 473–497.
- Mushegian A., Shepherd R.* Genetic elements of plant-viruses as tools for genetic engineering // *Microbiol. Rev.* 1995. Vol. 59. P. 548–569.
- Musil M., Richter J.* Serological properties of cucumber mosaic virus isolated from *Cucurbita pepo* L. in Slovakia // *Biologia*. 1983. Vol. 38, N 3. P. 237–244.
- Murant A.F.* The morphology of cucumber mosaic virus // *Virology*. 1965. Vol. 26, N 4. P. 538–544.
- Murayama D., Lu J.-F.* Some physical properties of northern cereal mosaic virus // *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 1967. Vol. 55, N 2. P. 182–190.
- Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L.* et al. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of virus*. VI Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses // *Arch. Virol.* 1995. Suppl. 10. 586 p.
- Nagai J., Choi Y.M., Tochihara H.* TMV-U a new strain of tobacco mosaic virus isolated from sweet pepper 3 // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1987. Vol. 53, N 4. P. 540–543.
- Nagai J., Takauchi T., Tochihara H.* A new mosaic of sweet pepper caused by pepper strain of tobacco mosaic virus // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1981. Vol. 47, N 4. P. 541–546.
- Nakamura S., Honkura R., Udaki T., Oshima M., Ohaschi Y.* Nucleotide sequence of the 3-terminal region of bean yellow mosaic virus and resistance to viral infection expressing its coat protein gene // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1994. Vol. 60. P. 295–304.
- Nakane P.K., Kawoi A.* Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugation // *J. Histochem. Cytochem.* 1974. Vol. 22, N 10. P. 1084–1091.
- Namba R., Sylvester E.* Transmission of cauliflower mosaic virus by the green peach, turnip, cabbage, and pea aphids (Homoptera, aphididae) // *J. Econ. Entomol.* 1981. Vol. 74. P. 546–551.
- Natti J.J.* Influence of cauliflower mosaic and turnip mosaic viruses on yields of cabbage in New York state // *Pl. Dis. Repr.* 1956. Vol. 40. P. 591–595.
- Navalinskiene M., Samuiliene M.* Decoratyviniu agalu virusines licos ir ju sukelejaikėjai Lietuvoje: Monografija. Kaunas: Lutute, 2006. 256 p.
- Nie X., Sing R.P.* A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiple PT-PCR // *J. Virol. Meth.* 2002. N 104. P. 41–54.

- Niegengerd E., Hest-Bucholz C.Z.* Elektromikroskopische Untersuchungen einer Virusinfektion (BYMV) von *Vicia faba* bei gleichzeitigen mineralstoffmangel // *Planz. Bodek.* 1983. Bd 146, H. 5. S. 589–603.
- Nilsson O., Little C., Sandberg G., Olsson O.* Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* rolC and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy // *Pl. Mol. Biol.* 1996. Vol. 31. P. 887–895.
- Odell J.T., Dudley R.K., Howell S.H.* Structure of the 19S RNA transcript encoded by the cauliflower mosaic virus genome // *Virology.* 1981. Vol. 111. P. 377–385.
- Oertel C.* Serologische Untersuchungen zum Verhalten des Tomatenaspermie-virus in *Chrisantemum indicum* L. // *Zbl. Bakteriol. Parasitenk. Infection. Hyg.* 1967. Bd 121, H. 3. S. 276–286.
- Ohno T., Aoyagi M., Yamanashi Y., Saito H., Ikawa S., Meshi T., Okado Y.* Nucleotide sequence of the tobacco mosaic virus (tomato strain) genome and comparison with the common strain genome // *J. Biochem.* 1984. Vol. 96. P. 1915–1923.
- Olszewski N., Hagen G., Guilfoyle T.* A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus // *Cell.* 1982. Vol. 29. P. 395–402.
- Olszewski N., Guilfoyle T.* Nucleine purified from cauliflower mosaic virus infected turnip leaves contain subgenomic, covalently closed circular cauliflower mosaic virus DNAs // *Nucl. Acids Res.* 1983. Vol. 11. P. 8901–8914.
- Okugama S., Kitayawa M.* Virus diseases of garden trees. IV. A mosaic disease of Sapanese snowflower (*Deutzia crenata* Sieb et Zucc) Caused by tobacco mosaic virus // *Sci. Rep. Fac. Agr. Ibaraki Univ.* 1974. N 22. P. 1–5.
- Omar R.A., Mehjar F.F., Zayed E.A., Deif A.A.* Biological studies on some seed-born viruses and their effect on vegetative growth and yield component of the host plants // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1985. Vol. 20, N 1/2. P. 59–78.
- Onki S., Inouye T.* Cucumber green mottle mosaic virus (Tobamovirus) // *Plant viruses in Asia* / eds Murayama D. et al. Gadjah Mada: Univ. Yogyakarta, 1998. P. 545–548.
- Onki S., Inouye T.* Soybean mosaic virus (Potyvirus) // *Plant viruses in Asia* / eds Murayama D. et al. Gadjah Mada: Univ. Yogyakarta, 1998. P. 814–817.
- Ortega A., Zamora M.C., Dominguez O.* *Vicia faba* infection y alteraciones histológicas por virus mosaico amarillo del friol (VMAF), *Fusarium solani* (Mart) Snyder et Hans Rhizoctonia *solani* Kuhn en haba *Vicia faba* // *Rev. Chpingo.* 1990. Vol. 15, N 67/68. P. 83–87.
- Osaki T., Arai S.* Studies on the viruses of solanaceous vegetables in Japan. II. A strain of tobacco mosaic virus isolated from pepper plants // *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. Biol.* 1975. Vol. 27. P. 15–32.
- Outober M.P. de Bruyn, van Slogteren E.* Het «Augusta» – ziekter tulpen een virus – ziekte van het tabaks-necrose type // *Tijdschrift. Plantenziekten.* 1949. Vol. 55, N 5. P. 262–271.
- Owen J., Palukaitis P.* Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA3 in eight CMV strains // *Virology.* 1988. Vol. 166, N 2. P. 495–502.
- Owen J., Shintaku M., Aeschleman P.* et al. Nucleotide sequences and evolutionary relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA2 // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 10. P. 2243–2249.
- Padma R., Arvind S., Chandra K.* Fluorescent antibody staining for detection of coconut root wilt antigen // *Curr. Sci. (India).* 1976. Vol. 45, N 8. P. 300–301.
- Palanichelvan K., Schoelz J.* A comparative analysis of the avirulence and translational transactivator functions of gene VI of cauliflower mosaic virus // *Virology.* 2002. Vol. 293. P. 225–233.
- Paliwal Y.C.* Rapid diagnosis of barley yellow dwarf virus in plants using serologically specific electron microscopy // *Phytopathol. Z.* 1977. Bd 89, H 1. S. 25–36.
- Paliwal Y.C.* Detection of barley yellow dwarf virus in aphids by serologically specific electron microscopy // *Can. J. Bot.* 1982. Vol. 60, N 2. P. 179–185.
- Palukaitis P., Zaitlin M.* Satellite RNAs of cucumber mosaic virus: characterization of two new satellites // *Virology.* 1984. Vol. 132, N 2. P. 426–435.
- Panjan M.* Primjena senzitivnijih seroloških reakcija kod dijagnostike virusa krumpira u gomolju // *Zastita Bilja.* 1969. Vol. 20, N 104. P. 109–113.



- Pares R.D., Bertus A.L.* Ultrastructure of mesophyll cells of species of *Crinum* infected with a potyvirus // *Phytopathol. Z.* 1978. Bd 91, H. 2. P. 170–181.
- Pares R.D., Gunn L.V.* The role of non-vectored soil transmission as a primary source of infection by pepper mild mottle and cucumber mosaic virus in glass house-grown *Capsicum* in Australia // *Phytopathol. Z.* 1989. Bd 126, H. 4. P. 353–360.
- Pares R.D., Whitecross M.* The detection and identification of plant viruses by immuno-electron microscopy (IEM) // *Micron.* 1982. Vol. 13, N 3. P. 305–306.
- Parks P.D., Dougherty W.G.* Substrate recognition by the NIa proteinase of two potyviruses involves multiple domains: characterization using genetically engineered hybrid proteinase molecules // *Virology.* 1991. Vol. 192, N 1. P. 17–27.
- Pauk J., Stefanov I., Fekete S.* et al. A study of different (CaMV 35S and MAS) promoter activities and risk assessment of field use in transgenic rapeseed plants // *Euphytica.* 1995. Vol. 85. P. 411–416.
- Paulechova K., Baumgartnerova H.* Some properties of tobacco necrosis virus isolated from plums // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1980. Vol. 15, N 1/4. P. 119–122.
- Paulsen A.O., Niblett C.L.* Purification and properties of foxtail mosaic virus // *Phytopathology.* 1977. Vol. 67, N 11. P. 1348–1351.
- Paulus A.O., Kendrick J.R., Weathers L.G.* Cucumber mosaic virus on pepper in California // *Phytopathology.* 1962. Vol. 52, N 1. P. 25.
- Peden K.W.C., Symons R.H.* Cucumber mosaic virus contains a functionally divided genome // *Virology.* 1973. Vol. 53, N 2. P. 487–492.
- Perry K.L., Zhang L., Palucaitis P.* Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* // *Virology.* 1998. Vol. 242, N 1. P. 204–210.
- Peters D.* Plant Rhabdovirus group // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1981. N 224. 3 p.
- Petrzik K., Benes V., Mraz I.* et al. Carnation etched ring virus – definitive member of the genus caulimovirus // *Virus. genes.* 1998. Vol. 16. P. 303–305.
- Pfeiffer P., Hohn T.* Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus: a detailed model and test of some aspects // *Cell.* 1983. Vol. 33. P. 781–789.
- Phillips S.* Tulip breaking potyvirus // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses.* 1996. P. 1331–1333.
- Plant viruses in Asia / eds Murayama D. et al. *Gadjah Mada: Univ. Press. Yogyakarta.* 1998. 1263 p.
- Plant viruses online – Index to Virus Species // *Descr. and Lists from the VIDE Database.* 1996. P. 1–114. <http://www.biology.enu.edu.au/Groups/Mes/vide/sppindex/htm/C>.
- Plumb R.T.* Epidemiology of barley yellow dwarf in Europe // *Barley Yellow Dwarf 60 Years of Progress. Minnesota. USA.* 1995. P. 107–127.
- Piazolla P., Diaz-ruiz J.R., Kaper J.M.* Nucleic acid homologies of eighteen cucumber mosaic virus isolates determined by competition hybridization // *J. Gen. Virol.* 1979. Vol. 45, N 2. P. 361–369.
- Pirone T.P., Pound G.S., Shepherd R.J.* Properties and serology of purified cauliflower mosaic virus // *Phytopathology.* 1961. Vol. 51. P. 541–546.
- Pirone T.P., Blanc S.* Helper-dependent vector transmission of plant viruses // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1996. Vol. 34. P. 227–247.
- Pooggin M., Futterer J., Skryabin K., Hohn T.* A short open reading frame terminating in front of a stable hairpin is the conserved feature in pregenomic RNA leaders of plant pararetroviruses // *J. Gen. Virol.* 1999. Vol. 80. P. 2217–2228.
- Pop I., Jilaveanu A.* O boala necrotica a vinetelor produs de virusul mozaicului tutunului // *Stud. Sci. Ser. biol.* 1975. Vol. 37, N 3. P. 239–243.
- Porta C., Devergne J.C., Cardin L.* et al. Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus // *Arch. Virol.* 1989. Bd 104, H. 3/4. S. 271–285.
- Price W.C.* The identification of certain viruses affecting Leguminous plants // *J. Agr. Res.* 1935. Vol. 51, N 7. P. 1017–1039.
- Price W.C.* Comparative host ranges of six plant viruses // *Amer. J. Bot.* 1940. Vol. 27, N 7. P. 530–541.

- Prigge R. Aktive Immunisierungsmethoden // Zbl. Bakteriell. Infektion. Org. 1949. Bd 153. H. 3/5. S. 161–171.
- Pringle C.R. Viruses Taxonomy-1999. The universal of viruses taxonomy, updated to include new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1988 // Arch. Virol. 1999. Bd 144, H 2. S. 421–429.
- Protcenko A.E., Procenko E.P. Some new virus diseases of ornamental plants // Proc. 5-th conf. «Plant Virology Czechosl. Plant Virologists». Prague, 1962. P. 241–245.
- Prochazkova Z. Presumed Role of Mucilage of Plantain Seeds in Spread of Tobacco mosaic virus // Biologia Plantarum. 1977. Vol. 19, N 4. P. 159–263.
- Proll E., Richter J. Serologische Untersuchungen mit dem Gurkenmosaik-virus. I. Virusreinigung und Antiserumherstellung // Arch. Pflanzenschutz. 1972. Vol. 8, N 5. P. 347–359.
- Provvidenti R.R. A mosaic from *Pisum sativum* caused by a strain of turnip mosaic virus // Pl. Dis. Repr. 1978. Vol. 62, N 6. P. 482–485.
- Provvidenti R.R., Schroeder W.T. Resistance in *Phaseolus vulgaris* to the severe strain of bean yellow mosaic virus // Phytopathology. 1973. Vol. 63, N 1. P. 196–197.
- Provvidenti R., Uyemoto J. Chlorotic leaf spotting of yellow summer squash caused by the severe strain of bean yellow mosaic virus // Pl. Dis. Repr. 1973. Vol. 57, N 3. P. 280–282.
- Provvidenti R., Gonsalves D., Humaydan H.S. Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California // Pl. Dis. Repr. 1984. Vol. 68, N 5. P. 443–446.
- Prowidenti R., Robinson R.W. Resistance to squash mosaic virus and watermelon mosaic virus 1 in *Cucumis metuliferus* // Pl. Dis. Repr. 1974. Vol. 58, N 10. P. 735–738.
- Purcifull D.E. Tobacco etch potyvirus // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1981. 7 p.
- Purcifull D.E., Hiebert E. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates // Phytopathology. 1979. Vol. 69, N 2. P. 112–116.
- Qiu S., Schoelz J. Three regions of cauliflower mosaic virus strain W260 are involve in systemic infection of solanaceous hosts // Virology. 1992. Vol. 190. P. 773–782.
- Qiu S., Wintermantel W., Sha Y., Schoelz J. Light-dependent systemic infection of solanaceous species by cauliflower mosaic virus can be conditioned by viral gene encoding an aphid transmission factor // Virology. 1997. Vol. 227. P. 180–189.
- Quemada H.L., Hostis B., Gonsalves D. et al. The nucleotide sequences of the 3'-terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P // J. Gen. Virol. 1990. Vol. 71, N 2. P. 203–210.
- Quemada H.L., Kearney C., Gonsalves D. et al. Nucleotide sequences of the coat protein genes and flanking regions of cucumber mosaic virus strains C and WLRNA3 // J. Gen. Virol. 1989. Vol. 70, N 5. P. 1065–1073.
- Quemada H., L., Sieu L.C., Siemientak D.R., Gonsalves D., Slighton J.L. Watermelon mosaic virus II and zucchini yellow mosaic virus: cloning of 3'-terminal regions nucleotide sequences, and phylogenetic comparisons // J. Gen. Virol. 1990. Vol. 71, N 7. P. 1451–1460.
- Rao A.L.N., Francki R.I.B. Distribution of determinants for symptom production and host range on the three RNA components of cucumber mosaic virus // J. Gen. Virol. 1982. Vol. 61, N 2. P. 197–205.
- Rao A.L.N., Hatta T., Francki R.I.B. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VII. Serological relationships reinvestigated // Virology. 1982. Vol. 116, N 1. P. 318–326.
- Rast A., Maat D. Yellow mosaic strains of *Capsicum* mosaic virus // Meded. Fac. Landbouwwetensch. Rijksuniv. Gent. 1986. Vol. 51, N 2B. P. 791–797.
- Raybov E.V., Roberts I.M., Palukaitis P. et al. Host-specific cell-to-cell and long-distance movements of cucumber mosaic virus are facilitated by the movement protein of groundnut rosette virus // Virology. 1999. Vol. 260, N 1. P. 98–108.
- Raybova L., Pooggin M., Dominguez D., Hohn T. Continuous and discontinuous ribosome scanning on the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is controlled by short open reading frames // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, P. 37278–37284.
- Raybould A.F., Maskell L.C., Edwards M.L. et al. The prevalence and spatial distribution of viruses in natural populations of *Brassica oleracea* // New Phytologist. 1999. Vol. 141. P. 265–275.



- Redondo E., Krause-Sakate R., Yang S.J., Lot H., Le Gail O., Candressen T.* Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome // *Mol. Pl. Microbe Interactions*. 2001. Vol. 14. P. 804–810.
- Reinero A., Beachy R.N.* Association of tobacco mosaic virus coat protein with chloroplast membranes in virus-infected leaves // *Pl. Mol. Biol.* 1986. Vol. 6, N 5. P. 291–301.
- Reinero A., Beachy R.N.* Reduced photosystem II activity and accumulation of viral coat protein in chloroplasts of leaves infected with tobacco mosaic virus // *Pl. Physiol.* 1989. Vol. 89, N 1. P. 111–116.
- Restrepo-Hartwig M.A., Carrington J.C.* The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication // *J. Gen. Virol.* 1994. Vol. 68, N 11. P. 2388–2397.
- Rezaian M.A., Williams R.H.V., Gordon K.H.J.* et al. Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA2 reveals a translation product significantly homologous to corresponding proteins of other viruses // *Eur. J. Biochem.* 1984. Vol. 143, N 2. P. 277–284.
- Rezaian M.A., Williams R.H.V., Symons R.H.* Nucleotide sequence of cucumber mosaic virus RNA1 // *Eur. J. Biochem.* 1985. Vol. 150, N 2. P. 331–339.
- Richins R.D., Shepherd R.J.* Physical maps of the genomes of Dahlia mosaic virus and Mirabilis mosaic virus – two members of the caulimovirus group // *Virology*. 1983. Vol. 124. P. 208–214.
- Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A.* Highlights and prospects of potyvirus molecular biology // *J. Gen. Virol.* 1992. Vol. 73, N 1. P. 1–6.
- Richter J., Proll E., Spaar D., Atabekov J.G.* Potato viruses M and S: characterization, differentiation, serodiagnosis // *Abstr. 4-th Inter. Virol. Congr. Virol. Hague. Wageningen, 1978.* P. 650.
- Richter J., Haack I., Eisenbrandt K.* Routinemässige Serodiagnose der Kartoffelviren X, S, M und Y mit dem Radiaimmuno diffusions test // *Arch. Pflanz.* 1979. Bd 15, H. 2. S. 81–88.
- Richter J., Proll E., Musil M.* Serological relationships between robinia mosaic, clover blotch and peanut stunt viruses // *Acta Virol.* 1979. Vol. 23, N 6. P. 489–496.
- Riederer M., Grimsley N., Hohn B., Jiricny J.* The mode of cauliflower mosaic virus propagation in the plant allows rapid amplification of viable mutant strains // *J. Gen. Virol.* 1992. Vol. 73. P. 1449–1456.
- Rist D.L., Lorbeer J.W.* Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New-York // *Phytopathology*. 1986. Vol. 79, N 1. P. 65–69.
- Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M., Boudazin G., Aster-Manificier S., Casse-Delbart F.* Nucleotide sequence of potato virus Y Z (N strain) genomic RNA // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 70, N 8. P. 935–947.
- Robaglia C.* Potyviruses taxonomy: from symptomology to molecular analysis // *Abstr. conf. Virus Diseases Poaceae in Europe. Versailles, France. 1995.* P. 23.
- Rochon D., Siegel A.* Chloroplast DNA transcripts are encapsidated by tobacco mosaic virus coat protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. Vol. 81, N 6. P. 1719–1723.
- Rocchan M., Iwaki M., Nasir S., Tantera D.M.* Virus disease of legume plants in Indonesia Bean yellow mosaic virus // *Contrib. Cont. Res. Inst. Agr.* 1978. N 45. 12 p.
- Rodriguez-Cerezo E., Shaw J.G.* Two newly detected nonstructural viral proteins in potyvirus-infected cells // *Virology*. 1991. Vol. 185, N 2. P. 572–579.
- Rodriguez D., Lopezabella D., Diazruiz JR.* An electron-microscopic study of cauliflower mosaic virus-induced viroplasm – unusual structures within the viroplasm matrix with possible functional-significance in the viral replication cycle // *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 1988. Vol. 100. P. 118–125.
- Roggero P., Ciuffo M., Lenzi R.* Natural infection by cucumber mosaic virus (Cucumovirus; Bromoviridae) in *Fuchsia boliviana* Carr and the insusceptibility of other *Fuchsia* species and hybrids to the virus // *Pl. Pathol.* 2000. Vol. 49, N 6. P. 802.
- Rojas M.R., Zerbini F.M., Allison R.F.* et al. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins // *Virology*. 1997. Vol. 237, N 2. P. 283–295.
- Rollo F., Covey S.* Cauliflower mosaic virus DNA persists as supercoiled forms in cultured turnip cells // *J. Gen. Virol.* 1985. Vol. 66. P. 603–608.
- Roossinck M.J.* Cucumber mosaic virus, a model for RNA virus evolution // *Mol. Pl. Pathol.* 2001. Vol. 2, N 2. P. 59–63.

- Rothnie H., Chapdelaine Y., Hohn T. Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies // *Adv. Virus Res.* 1994. Vol. 44. P. 1-67.
- Rubio-Huertos M., Matsui C., Yamaguchi A., Kamei T. Electron microscopy of X-body formation in cells of cabbage infected with Brassica virus 3 // *Phytopathology.* 1968. Vol. 58. P. 548-549.
- Russell G.J., Follett E.A.C., Subak-Sharpe J.H., Harrison B.D. The double-stranded DNA of cauliflower mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1971. Vol. 11. P. 129-138.
- Russo M., Kisshan A.A., Tobra M.A. A disease of lentil caused by Bean yellow mosaic virus in Egypt // *Plant Dis.* 1981. Vol. 65, N 7. P. 611-612.
- Ryzhkova A., Shevchenko T.P., Budzanivska I.G., Polischuk V.P. Virus of Cucumber Isolated from Some Regions of Ukraine // *Pl. Protect. Sci.* 2002. Vol. 38 (Special Issue). P. 261-263.
- Saito T., Hasokawa D., Meshi T., Okada Y. Immunocytochemical localization of the 130K and 180K proteins (putative replicase components) of tobacco mosaic virus // *Virology.* 1987. Vol. 160, N 7. P. 477-481.
- Saito T., Yamanaka K., Watanabe Y., Takamatsu N., Meshi T., Okada Y. Mutational analysis of the coat protein gene of tobacco mosaic virus in relation to hypersensitive response in tobacco plants with N<sup>1</sup> gene // *Virology.* 1989. Vol. 173, N 1. P. 11-20.
- Salazar M.L. Potato viruses after the XX century effects, dissemination and their control // *Mater. Participants Pyongyang Inter. Sci. Simpos. Potato. Peohangan, DPRK.* 2003. P. 35-42.
- Salmanian A., Gushchin A., Medvedeva T. et al. Synthesis and expression of tee gene for human epidermal growth factor in transgenic potato plants // *Biotechnol. Lett.* 1996. Vol. 18. P. 1095-1098.
- Sammons B., Barnett O.W., Davis R.F. et al. A survey of viruses infected yellow summer squash in South Carolina // *Plant Dis.* 1989. Vol. 73, N 5. P. 401-404.
- Sanger M., Daubert S., Goodman R.M. The regions of sequence variation in caulimovirus gene VI // *Virology.* 1991. Vol. 182. P. 830-834.
- Saunders K., Lucy A.P., Covey S.N. Susceptibility of Brassica species to cauliflower mosaic virus infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71. P. 1641-1647.
- Schmidt I., Blanc S., Esperandien P. et al. Interaction between the aphid transmission factor and virus-particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission // *Pros. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 8885-8889.
- Schoelz J.E., Shepherd R.J., Daubert S. Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant // *Mol. Cell Biol.* 1986 a. Vol. 6. P. 2632-2637.
- Schoelz J.E., Shepherd R.J., Richins R.D. Properties of an unusual strain of cauliflower mosaic virus // *Phytopathology.* 1986 b. Vol. 76. P. 451-454.
- Schoelz J.E., Shepherd R.J. Host range control of cauliflower mosaic virus // *Virology.* 1988. Vol. 162, N 1. P. 30-37.
- Scholthof H., Wu F., Kiernan J., Shepherd R.J. The putative zing finger of a caulimovirus is essential for infectivity but does not influence gene expression // *J. Gen. Virol.* 1993. Vol. 74. P. 775-780.
- Schroeder H., Schotz A., Wardleyrichardson T. et al. Transformation and regeneration of 2 cultivars of pea (*Pisum sativum* L.) // *Pl. Physiol.* 1993. Vol. 101. P. 751-757.
- Schubert J., Rabenstein F., Proll E. Sequence of the 3'-part of the RNA of regrass mosaic potyvirus // *Abstr. conf. Virus Diseases Poaceae in Europe. Versailles, France.* 1995. P. 26.
- Schultz E.S. A transmissible mosaic disease of Chinese cabbage, mustard and turnip // *J. Agr. Res.* 1921. Vol. 22. P. 173-177.
- Schwinghamer M.W., Symons R.H. Fractionation of cucumber mosaic virus RNA and its translation in a wheat embryo cell-free system // *Virology.* 1975. Vol. 63, N 2. P. 252-262.
- Schwinghamer M.W., Symons R.H. Translation of the four major RNA species of cucumber mosaic virus in plant and animal cell free system and toad oocytes // *Virology.* 1977. Vol. 79, N 1. P. 88-108.
- Scott H.A. Serological behavior of cucumber mosaic virus (strain Y) and the virus protein // *Virology.* 1963. Vol. 34, N 1. P. 79-90.



- Scott H.A. Purification of cucumber mosaic virus // *Virology*. 1963. Vol. 20, N 1. P. 103-106.
- Sela I. Plant-virus interaction related to resistance and localization of viral infection // *Adv. Virus Res.* 1981. Vol. 26. P. 201-237.
- Shababi M., Schoel J. Characterisation of the Solanaceae host range of five strains of cauliflower mosaic virus // *Phytopathology*. 1994. Vol. 84, N 10. P. 1133-1136.
- Shalla T.A. Electron microscopy of cells infected with barley stripe mosaic virus as a result of mechanical and seed transmission. Viruses of plant. Amsterdam, 1966. 129 p.
- Shalla T.A., Shepherd R.J., Petersen L.J. Comparative cytology of nine isolates of cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1980. Vol. 102, N 2. P. 381-388.
- Shalla T.A., Petersen L.J., Zaitlin M. Restricted movement of a temperature-sensitive virus in tobacco leaves is associated with a reduction in numbers of plasmodesma // *J. Gen. Virol.* 1982. Vol. 60, N 2. P. 355-358.
- Shaw J.G., Ptásková K.A., Wilson T.M.A. Evidence that tobacco mosaic virus particles disassemble cotranslationally *in vivo* // *Virology*. 1986. Vol. 148, N 2. P. 326-336.
- Shepherd R.J., Wakeman R.J., Romanko R.R. DNA in cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1968. Vol. 36. P. 150-153.
- Shepherd R.J., Bruening G.E., Wakeman R.J. Double-stranded DNA from cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1970. Vol. 41. P. 339-347.
- Shepherd R.J., Wakeman R.J. Observation on the size and morphology of cauliflower mosaic virus // *Phytopathology*. 1971. Vol. 61. P. 188-193.
- Shepherd R.J., Richings R., Shalla T.A. Isolation and properties of the inclusion bodies of cauliflower mosaic virus // *Virology*. 1980. Vol. 102. P. 389-400.
- Shewmaker C., Caton J., Houck C., Gardner C. Transcription of cauliflower mosaic virus integrated into plant genomes // *Virology*. 1985. Vol. 140. P. 281-288.
- Shintaku M.H., Carter S.A., Bao Y., Nelson R.S. Mapping nucleotides in the 126 kDa protein gene that control the differential symptoms induced by two strains of tobacco mosaic virus // *Virology*. 1996. Vol. 221, N 1. P. 218-225.
- Shirako Y., Ehara Y. Composition of northern cereal mosaic virus and its detection by enzyme-linked immunosorbent assay with anti-nucleocapsid serum // *Phytopathology*. 1985. Vol. 75, N 4. P. 453-457.
- Shukla D.D., Schmelzer K. Studies on viruses and virus diseases of cruciferous plants. VII. Occurrence and effects of cabbage black ring and cauliflower mosaic viruses on brassica crops // *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 1972. Vol. 7. P. 325-342.
- Shukla D.D., Gough K.H. The use of protein A from *Staphylococcus aureus* in immune electron microscopy for detecting plant virus particles // *J. Gen. Virol.* 1979. Vol. 45, N 4. P. 533-536.
- Shukla D.D., Inglis A.S., McKern N.M., Gough K.H. Amino acid sequence of the coat protein of potato virus Y // *Virology*. 1986. Vol. 152, N 1. P. 118-125.
- Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L., Gough K.H., Ward C.W. The N- and C- termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes // *J. Gen. Virol.* 1988. Vol. 69, N 12. P. 1497-1508.
- Shukla D.D., Ward C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group // *J. Gen. Virol.* 1988. Vol. 69, N 11. P. 2703-2710.
- Shukla D.D., Jilka J., Tosic M., Tord R.E. A novel approach to the serology of potyviruses involving affinity-purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 80, N 1. P. 13-23.
- Silber G., Burk L.G. Infectivity of tobacco mosaic virus stored for fifty years in extracted «unpreserved» plant juice // *Nature*. 1965. N 206. P. 740-741.
- Simay E.I., Beszner L. Occurrence of a seed transmitted strain of bean yellow mosaic virus on *Vicia faba* L. // *Fabis Newslett.* 1991. N 28. P. 36-37.
- Simons J.N. Three strains of cucumber mosaic virus affecting bell pepper in the everglades area of South Florida // *Phytopathology*. 1957. Vol. 47, N 3. P. 145-150

- Singh J.S., Rhurana P.S.M., Lal S.B.* An atypical isolate of the potato virus Y // *J. Indian Potato Assoc.* 1983. Vol. 10, N 1. P. 42-49.
- Sinilkumar G., Mohr L., Lopata-Finch E.* et al. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP // *Pl. Mol. Biol.* 2002. Vol. 50. P. 463-474.
- Sit M.L., White K.A., Holy S.* et al. Complete nucleotide sequence of clover yellow mosaic virus RNA // *J. Gen. Virol.* 1990. Vol. 71, N 9. P. 1913-1920.
- Sleat D.E., Palukaitis P.* Site-directed mutagenesis of a plant viral satellite RNA changes its phenotype from ameliorative to necrogenic // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87, N 8. P. 2946-2950.
- Slykhuis J.T.* Virus and Virus-like diseases of cereal crops // *Ann. Rev. Phytopathol.* 1976. Vol. 55, N 2. P. 182-190.
- Smith K.M.* Composite nature of some potato group // *Nature.* 1931. Vol. 127. P. 702.
- Smith K.M.* A textbook of plant viruses diseases. L.: Churshill, 1937. 115 p.
- Smith K.M.* A textbook of plant virus diseases. 3-rd ed. L.: Losman, 1972. 615 p.
- Smith K.M., Bald J.G.* A description of a necrotic virus disease affecting tobacco and other plants // *Parasitology.* 1935. Vol. 27, N 3. P. 231-245.
- Smith K.M., Dennis R.W.G.* Some notes on a suspected variant of *Solanum virus 2* (Potato virus Y) // *Ann. Appl. Biol.* 1940. Vol. 27. P. 65-70.
- Sohal A., Love A., Cecchini E.* et al. Cauliflower mosaic virus infection stimulates lipid transfer protein gene expression in Arabidopsis // *J. Exp. Botany.* 1999. Vol. 50. P. 1727-1733.
- Spak J., Novikov V.K.* The occurrence of mixed infections of turnip mosaic virus, cauliflower mosaic and cucumber mosaic viruses in winter oilseed rape from the territory of Uzbekistan // *Acta Virologica.* 1944. Vol. 38. P. 39-42.
- Spak J., Rubelkova D.* Serological variability among European isolates of radish mosaic virus // *Pl. Pathol.* 2000. Vol. 49. P. 295-301.
- Staar G.* Blumenkohlvirosen // *Tag. Deutsche Akad. Landwirtschafts Wiss.* 1962. Bd 51. S. 45-51.
- Stein A., Loebenstein G., Koenig R.* Detection of cucumber mosaic virus and bean yellow mosaic virus in gladiolus by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) // *Pl. Dis. Repr.* 1979. Vol. 63, N 3. P. 185-188.
- Steinfiss H.N.* Genome variability of bymoviruses. // *Absrt. conf. Virus Diseases Poaceae in Europe.* Versailles, France. 1995. P. 30.
- Stefanas Z.* Virus zute krzljivoste crvenog luka u Jugoslaviji // *Acta bot. Croat.* 1977. Vol. 36. P. 39-45.
- Stegwee D., Ponsen M.B.* Multiplication of potato virus in aphid *Myzus persicae* (Sulz.) // *Entomolog. Exp. Appl.* 1958. Vol. 1, N 4. P. 291-300.
- Steward V.B., Reddick D.* Study of virus (common mosaic) on *Phaseolus vulgaris* // *Phytopathology.* 1917. N 7. P. 61-65.
- Stoenescu A.* Virusurile culturilor de ardei Si comobaterea lor // *Prod. Veg. Hort.* 1984. Vol. 33, N 9. P. 9-13.
- Sun L., Cai H., Xu W., Hu Y., Lin Z.* CaMV 35S promoter directs beta-glucuronidase expression in *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus citrinopileatus* // *Mol. Biotechnol.* 2002. Vol. 20. P. 239-244.
- Sulzinski M.A., Zaitlin M.* Tobacco mosaic virus replication in resistant and susceptible plants: in some resistance species virus is confined to a small number of initially infected cells // *Virology.* 1982. Vol. 121, N 1. P. 12-19.
- Suzuki N., Kimura L.* Purification, bioassay, properties and serology of rice viruses // *The virus diseases of the rice plant.* Baltimore, 1969. P. 207-221.
- Suzuki N., Kudo T., Shirako Y.* et al. Distribution of cylindrical inclusion, amorphous inclusion and capsid proteins of watermelon mosaic virus 2 in systemically infected pumpkin leaves // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 70, N 5. P. 1085-1091.
- Suzuki M., Kuwata S., Masuta S.* et al. Point mutations in the coat protein of cucumber mosaic virus affect symptom expression and virion accumulation in tobacco // *J. Gen. Virol.* 1995. Vol. 76, N 7. P. 1791-1799.



- Symons R.H.* Viral genome structure // *The Plant Viruses* / ed Francki R.I.B. N. Y.; L.: Plenum Press, 1985. Vol. 1. P. 434-453.
- Takahashi Y., Kamyra-Iwaka M., Shohara K., Toriyama S.* Detection of Watermelon Strain of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus by Using Monoclonal Antibodies // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1989. Vol. 55. P. 369-372.
- Takahashi K., Nanaka T., Iida W., Tsud Y.* Studies on virus diseases and causal viruses of soybean in Japan // *Bull. Tohoku Agr. Exp. Stn.* 1980. Vol. 62. P. 1-30.
- Takanami Y.* A striking change in symptoms on cucumber mosaic virus-infected tobacco plants induced by satellite RNA // *Virology*. 1981. Vol. 109, N 1. P. 120-126.
- Taitansky M.E., Atabekova T.I., Kaplan I.B., Morozov S.Y., Malysenko S.I., Atabekov J.G.* A study of TMV tsmutanti NI 2519. I. Complementation experiments // *Virology*. 1982 a. Vol. 118, N 2. P. 301-308.
- Taitansky M.E., Malysenko S.I., Pshennikova E.S., Kaplan I.B., Ulanova E.F., Atabekov J.G.* Plant virus-specific transport function. I. Virus genetic control required for systemic spread // *Virology*. 1982 b. Vol. 122, N 2. P. 318-326.
- Tanzi M., Betti L., Bertaccini A., Canova A.* Pepper mosaic virus strains and their adaptation to the host // *Phytopathol. Medit.* 1988. N 27. P. 28-35.
- Taraki A.* Special strain of bean yellow mosaic virus // *Acta Biol. Amer. Exp. (SERJ)*. 1979. Vol. 4, N 1. P. 47-59.
- Tatchell S.P., Baggett J.R., Hampton R.O.* Relationship between resistance to severe and type strains of the Bean yellow mosaic virus // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1985. Vol. 110, N 1. P. 96-99.
- Tavartris S.H.* Improved purification of two potato carlaviruses // *Phytopathology*. 1983. Vol. 73, N 2. P. 190-194.
- Tavantzis S.H.* Physicochemical of potato virus M // *Virology*. 1984. Vol. 132, N 2. P. 427-430.
- Taylor R.H., Hewitt W.* Properties and serological relationships of Australian and Californian soil-borne virus of the grapevine and arabis mosaic virus // *Austral. J. Agr. Res.* 1964. Vol. 15, N 4. P. 571-585.
- Teale D.S.* Necrotic symptoms of tobacco necrosis virus in roots // *Phytopathology*. 1962. Vol. 52, N 10. P. 1037-1041.
- Thomas B.J.* The detection by serologically specific electron microscopy of viruses infecting rose and other hardy nursery stock plants // *Micron*. 1980. Vol. 12, N 2. P. 175-176.
- Thomas C., Maule A.* Identification of structural domains within the cauliflower mosaic virus movement protein by scanning deletion mutagenesis and epitope tagging // *Plant Cell*. 1995. Vol. 7. P. 561-572.
- Thomas C., Perbal C, Maule, A.* A mutation of cauliflower mosaic virus gene I interferes with virus movement but not virus replication // *Virology*. 1993. Vol. 192. P. 415-421.
- Thomas W.* Watermelon mosaic virus the cause of a serious disease of cucurbits in the Cook Islands // *New Zealand J. Exp. Agr.* 1980. Vol. 8, N 3/4. P. 309-312.
- Thornbury D.W., Pirone T.P.* Helper components of two potyviruses are serologically distinct // *Virology*. 1983. Vol. 125, N 2. P. 487-490.
- Thung T.H.* Tobacco necrosis virus associated latent infection of pepino (*Solanum miricatum*) // *Ann. Appl. Biol.* 1980. Vol. 95, N 2. P. 191-196.
- Tobias I., Rast A., Maat D.* Comparison of some tobamoviruses from pepper with U1 strain of TMV by test plants and serology // *Proc. Inter. Pl. Prot.* 1983. N 3. P. 46-52.
- Tochihara H.* Studies on the viruses of Japanese radish mosaic disease. Studies properties of radish R virus // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1963. Vol. 28, N 1. P. 31-39.
- Tomaru K.* Cauliflower mosaic virus (Caulimovirus) // *Plant viruses in Asia*. Gadjah Mada: University Press, 1998. P. 501-503.
- Tomimura K., Spak J., Katis N., Jenner C.E., Walsh J.A., Gibbs A.J., Ohshima K.* Comparisons of the genetic structure of populations of the Turnip mosaic virus in west and east Eurasia // *Virology*. 2004. Vol. 330. P. 408-423.
- Tomlinson J.A., Shepherd R.J., Walker J.C.* Purification, properties and serology of cucumber mosaic virus // *Phytopathology*. 1959. Vol. 49. P. 293-299.

- Tomlinson J.A.* Turnip mosaic virus // CMI/AAB Descr. Pl. Viruses. 1970. N 11. 4 p.
- Tomlinson J.A., Walker V.M.* Further studies on seed transmission in the ecology of some aphid transmitted viruses // Ann. Appl. Biol. 1973. Vol. 73. P. 293–298.
- Tomlinson J.A., Ward C.M.* The reaction of swede (*Brassica rarus*) to infection by turnip mosaic virus // Ann. Appl. Biol. 1978. Vol. 89, N 1. P. 61–69.
- Tompkins C.M.* A mosaic disease of radish in California // J. Agr. Res. 1939. Vol. 58, N 1. P. 119–130.
- Tolkach V.F., Gnutova R.V.* Taxonomy of Phytopathogenic viruses identified in the Russian Far East // Arch. Phytopathol. Pflanz. 2000. Vol. 33. P. 187–205.
- Tolkach V.F., Gnutova R.V.* The new for South Far East Russia of Caulimoviruses: cauliflower mosaic and dahlia mosaic // Abstr. VII-th Inter. Symp. Pl. Virus Epidemiology. Germany, Aschersleben. 2002. P. 123.
- Tosic M., Videnov E.* Prilog proucavanju nekih izolata virus mozaika duvana in paprike // Zast. Bilja. 1981. Vol 32, N 157. P. 285–292.
- Tosic M., Krstic B., Obradovic I., Milosevic D.* ELISA metoda otkrivanja zajednicke epitope viruschin antigena // Zast. Bilja. 1990. Vol. 41, N 2. P. 165–172.
- Traub H.P.* The Amaryllis Manua // N. Y.: Amer. Amaryllis Soc, 1958. 117 p.
- Tracy S.L., Frenkel M.J., Dough R.H., Hanna P.J., Shukla D.D.* Bean yellow mosaic clove, yellow vein and pea mosaic are distinct potyviruses // Arch. Virology. 1992. Vol. 122, N 3/4. P. 249–261.
- Tremblay M.F., Nicolas O., Sinha R.C., Lazure C., Laliberte J.F.* Sequence of the 3'-terminal region of turnip mosaic virus RNA and the capsid protein gene // J. Gen. Virol. 1990. Vol. 71, N 11. P. 2769–2772.
- Tripathi G., Yoshii R.D.* Watermelon mosaic virus in pumpkin // Indian Phytopathol. 1985. Vol. 38, N 2. P. 244–247.
- Torruella M., Gordon K., Hohn T.* Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 2819–2825.
- Tsuge S., Kobayashi K., Nakayachiki H. et al.* Cauliflower mosaic virus ORF III product forms a tetramer on planta: its implication in viral DNA folding during encapsidation // Microbiol., Immunol. 1999. Vol. 43. P. 773–780.
- Tsugita A., Gish D.T., Young J., Fraenkel-Conrat H., Knight C.A., Stanley W.M.* The complete amino acid sequence of the protein of tobacco mosaic virus // Proc. Natl. Acad. Sci. US. 1960. N. 46. P. 1463–1469.
- Turner D., McCallum D., Covey S.* Roles of the 35S promoter and multiple overlapping domains in the pathogenicity of the pararetrovirus cauliflower mosaic virus // J. Virol. 1996. Vol. 70. P. 4514–4521.
- Uyemoto J.K., Grogan R.G.* Chemical characterization of tobacco necrosis and satellite viruses // Virology. 1969. Vol. 39, N 1. P. 79–89.
- Vaden V., Melcher U.* Recombination sites in cauliflower mosaic virus DNAs: implications for mechanisms of recombination // Virology. 1990. Vol. 177. P. 717–726.
- Valdes E., Perz N., Surli J.* Inclusiones citoplasmaticas en plantas de frijol infectadas con el virus del moscirico comun del frijolo (BCMV) // Science Agr. (Academia de Ciencias de Cuba). 1982. N 11. P. 50–52.
- Valkonen J.P.T.* Natural genes and mechanism for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.) // Plant Breeding. 1994. Vol. 112. P. 1–16.
- Van Loon L.C.* Disease induction by plant viruses // Adv. Virus Res. 1987. Vol. 33. P. 205–255.
- Van Regenmortel M.H.V.* Zone electrophoresis and electron microscopy of a watermelon mosaic virus in South Africa // Virology. 1960. Vol. 12, N 1. P. 127–130.
- Van Regenmortel M.H.V.* Zone electrophoresis and particle size of cucumber mosaic virus // Virology. 1961. Vol. 15, N 1/2. P. 221–223.
- Van Regenmortel M.H.V.* Diagnostic d'infections virales chez les plantes // Biofutur. 1986. N 44. P. 91–92.
- Van Regenmortel M.H.V., Brandes J., Bercks R.* Investigations on the properties of watermelon mosaic virus // Phytopathol. Z. 1962. Bd 45. H. 3. S. 205–216.



- Van Regenmortel M.H.V., Hendry D.A., Baltz T.* A reexamination of the molecular size of cucumber mosaic virus and its coat protein // *Virology*. 1972. Vol. 49, N 3. P. 647–653.
- 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*. N. Y.; San Diego: Acad. Press, 2000. 1121 p.
- Van Slogteren D.H.M.* Ratelvirus als oorzaak van ziekte in bloembolgewassen en de mogelijkheden de infectie door middel van grondonfsmetting te bestrijden // *Tijdschrift. Plantenziekten*. 1958. Vol. 64, N 5/7. P. 452–462.
- Veerisetty V., Brakke M.K.* Alfalfa latent virus: A Naturally occurring carlavirus in alfalfa // *Phytopathology*. 1977. Vol. 67, N 10. P. 1202–1206.
- Veerisetty V., Brakke M.K.* Purification of some legume carlaviruses // *Phytopathology*. 1978. Vol. 68, N 1. P. 59–64.
- Viellasana H.F.A., Monfessoro R.R.* Identification del virus mosaico de la calabaza en *Cucurbita* spp y sus vectores // *Agrociencia*. 1987. Vol. 141, N 1. P. 43–50.
- Virus of Plants. Descriptions and List from the VIDE Database / eds. Drunt A., Crabtree K.* et al. CAB INTERNATIONAL. UK. L.: Univ. Press, 1996. 1484 p.
- Volovitch M., Modotahedi N., Chouikh Y., Yot P.* Conserved and non-conserved restriction sites are interspersed in the DNA of cauliflower mosaic virus // *Biochem. Int.* 1981. Vol. 3. P. 225–232.
- Wahyuni W.S., Dietzgen R.G., Hanada K.* et al. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus // *Pl. Path.* 1992. Vol. 41, N 3. P. 282–297.
- Walker K.J.* Biology of bean yellow mosaic and pea leafroll viruses affecting *Vicia* in Iran // *Phytopathol. Z.* 1973. Bd 78. H 3. S. 253–263.
- Walker J.C., Lebean F.J., Pound G.S.* Viruses associated with cabbage mosaic // *J. Agr. Res.* 1945. Vol. 70. P. 379–404.
- Ward C.W., Shukla D.D.* Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions // *Intervirology*. 1991. Vol. 32, N 5. P. 269–296.
- Was M., Chrzanowska M.* Komunikat o wykryciu wirusa mozaiki tytoniowej w roślinach babki zwyczajnej (*Plantago maior* L.) // *Bull. Inst. Ziemi.* 1971. N 8. P. 49–54.
- Waterworth H.E., Tousignant M.E., Kaper J.M.* A lethal disease of tomato experimental induced by RNA5 associated with cucumber mosaic virus isolated from *Commelina* from El Salvador // *Phytopathology*. 1978. Vol. 68, N 4. P. 561–566.
- Webb R.E.* Separation and identification of some viruses infectious to cucurbits // *Phytopathology*. 1961. Vol. 51, N 11. P. 802–803.
- Webb R.E.* Watermelon mosaic viruses 1 and 2 in squash on the Atlantic seaboard // *Pl. Dis. Repr.* 1971. Vol. 55, N 2. P. 132–135.
- Webb R.E., Scott H.A.* Relations of 10 isolates of watermelon mosaic virus // *Phytopathology*. 1964. Vol. 54, N 7. P. 749.
- Webb R.E., Scott H.A.* Isolation and identification of watermelon mosaic virus 1 and 2 // *Phytopathology*. 1965. Vol. 55, N 4. P. 895–900
- Weber K., Osborn M.* The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *J. Biol. Chem.* 1969. Vol. 224, N 16. P. 4406–4410.
- Weimer J.L.* Symptoms of disease of alfalfa mosaic virus // *Phytopathology*. 1931. N 21. P. 122–124.
- Weimer J.L.* Studies on alfalfa mosaic // *Phytopathology*. 1934. Vol. 24, N 4. P. 329–347.
- Weilgyny H., Sing R.P.* Separation of Slovenian isolates of PVY<sup>NTN</sup> from North American isolates of PVY<sup>N</sup> by 3-primer PCR // *J. Virol. Method.* 1998. Vol. 71. P. 57–68.
- Wetter C., Dore I., Bernard M.* Bell pepper mottle virus, a distinct tobamovirus infecting pepper // *Phytopathol. Z.* 1987. Bd 119, H. 4. S. 333–344.
- Wiedemann H.L., Maiss E.* Detection of the potato tuber necrotic ringspot stain of potato virus Y (PVY<sup>NTN</sup>) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction // *J. Virol. Methods*. 1996. Vol. 103. P. 377–345.
- Wildy P.* Classification and nomenclature of viruses // 1-st Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Monogr. *Virology*. 1971. N 5. 81 p.

- Wilsh K., Nort J., Barker I., Boonham N. Detection of different strains of *Potato virus Y* and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR // *J. Virol. Methods*. 2001. Vol. 91, N 2. P. 167–173.
- Wilson T.M.A. Cotranslational disassembly of tobacco mosaic virus *in vitro* // *Virology*. 1984. Vol. 137, N 2. P. 255–265.
- Wilson J., Rorald C. Subyerranien clover red leaf virus and other legume viruses in Canterbury // *New Zeland Agr. Res.* 1973. Vol. 78, N 3. P. 253–268.
- Wittmann H.G., Wittmann-Liebold B. Protein chemical studies of two RNA viruses and their mutants // *Cold Spring Harbor Sympos. Quant. Biol.* 1966. N 31. P. 163–172.
- Wolf C., Scherzinger M., Wurzl A. et al. Detection of cauliflower mosaic virus by the polymerase chain reaction: testing of food components for false-positive 35S-promoter screening results // *European Food Research and Technology*. 2000. Vol. 210. P. 367–372.
- Woolston C.J., Czaplowski L.G., Marham P.G. et al. Location and sequence of a region of cauliflower mosaic virus gene II responsible for aphid transmissibility // *Virology*. 1987. Vol. 160. P. 246–251.
- Xiong L., Hiebert E., Purcifull D.E. Characterization of the peanut virus genome by *in vitro* translation // *Phytopathology*. 1988. Vol. 78, N 8. P. 1128–1134.
- Yamamoto T., Yoshii H., Katsube T. Serological grouping of watermelon mosaic virus isolates // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1982. Vol. 48, N 5. P. 613–619.
- Yamaoka N., Furusawa I., Yamamoto M. Infection of turnip protoplasts with cauliflower mosaic virus DNA // *Virology*. 1982 a. Vol. 122. P. 503–505.
- Yamaoka N., Morita T., Furusawa I., Yamamoto M. Effect of temperature on the multiplication of cauliflower mosaic virus // *J. Gen. Virol.* 1982 b. Vol. 61. P. 283–287.
- Yilma A., Witcher W., Barnett O.W. Viruses of bell pepper, eggplant and tomato found in South Carolina // *Phytopathology*. 1984. Vol. 75, N 5. P. 634.
- Yoshii H. On the strain distribution of turnip mosaic virus // *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 1963. Vol. 28, N 4. P. 221–227.
- Young M.J., Daubert S.D., Shephert R.J. Gene I products of cauliflower mosaic virus detected in extracts of infected tissue // *Virology*. 1987. Vol. 158. P. 444–446.
- Yu M.H., Frenkel M.J., Mekern N.M. et al. Coat protein of potyviruses. 6. Amino acid sequences suggest watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N are strains of the same potyvirus // *Arch. Virol.* 1989. Bd 105, H. 1/2. S. 55–64.
- Yuki V.A., Rezende J.A.M., Kitajima E.W. et al. Occurrence, distribution, and relative incidence of five viruses infecting cucurbits in the state of San Paulo, Brazil // *Plant Dis.* 2000. Vol. 84, N 5. P. 516–520.
- Zaitlin M., Israel H.W. Tobacco mosaic virus (type strains) // *CMI/AAB Descr. Pl. Viruses*. 1975. N 151. 5 p.
- Zaitlin M., Hull R. Plant virus-host interactions // *Ann. Rev. Pl. Physiol.* 1987. Vol. 38. P. 291–315.
- Zavriev S.K. *Carlavirus* // *Encyclopedia of Virology*. USA: Acad. Press, 1994. P. 214–218.
- Zavriev S.K. *Carlavirus*. 2-ed ed. // *Encyclopedia of Virology*. USA: Acad. Press, 1999. P. 238–242.
- Zavriev S.K., Kanyuka K.V., Levuy K.E. The genome organization of potato virus M genomic RNA // *J. Gen. Virol.* 1991. Vol. 72. P. 12–14.
- Zavriev S.K., Ryabov E.A., Vishnichenko V.K. Genus *Allexivirus* // *Virus taxonomy. Classification and nomenclature Viruses: 7-th Report of the International committee on Taxonomy of Viruses* / eds Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L. et al. N. Y.; San Diego: Acad. Press, 1999. P. 981–985.
- Zettler F.W., Ko N.-J., Wusler G.C., Elliot M.S., Wong S.-M. Viruses of orchids and their control // *Plant Disease*. 1990. Vol. 74, N 9. P. 621–626.
- Zijlstra C., Scharer-Hernandez N., Gal S., Hohn T. *Arabidopsis thaliana* expressing the cauliflower mosaic virus ORF VI transgene has a late flowering phenotype // *Virus genes*. 1996. Vol. 13, N 1. P. 5–17.
- Zhang X.S., Melcher U. Competition between isolates and variants of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants // *J. Gen. Virol.* 1989. Vol. 70. P. 3427–3437.
- Zhang L., Hanada K., Palucattis P. Mapping local and systemic symptom determinants of cucumber mosaic cucumovirus in tobacco // *J. Gen. Virol.* 1994. Vol. 75, N 11. P. 3185–3191.



## Оглавление

Предисловие от автора .....	5
Список принятых сокращений .....	8
Современная таксономия и номенклатура вирусов растений .....	12
Семейство <i>Caulimoviridae</i> .....	36
Род <i>Caulimovirus</i> .....	37
Вирус мозаики цветной капусты <i>Cauliflower mosaic virus</i> .....	55
Вирус мозаики георгины <i>Dahlia mosaic virus</i> .....	71
Семейство <i>Rhabdoviridae</i> .....	76
Род <i>Cytorhabdovirus</i> .....	78
Вирус закукливания злаков <i>Oat pseudorosette virus</i> .....	79
Вирус северной мозаики злаков <i>Northern cereal mosaic virus</i> .....	81
Семейство <i>Luteoviridae</i> .....	88
Род <i>Luteovirus</i> .....	89
Вирус желтой карликовости ячменя <i>Barley yellow dwarf virus</i> .....	89
Род <i>Polerovirus</i> .....	94
Вирус скручивания листьев картофеля <i>Potato leafroll virus</i> .....	94
Род <i>Enamovirus</i> .....	96
Вирус деформирующей мозаики гороха I <i>Pea enation mosaic virus I</i> .....	96
Семейство <i>Tombusviridae</i> .....	98
Род <i>Necrovirus</i> .....	99
Вирус некроза табака <i>Tobacco necrosis virus</i> .....	100
Семейство <i>Bromoviridae</i> .....	110
Род <i>Alfavirus</i> .....	111
Вирус мозаики люцерны <i>Alfalfa mosaic virus</i> .....	111
Род <i>Bromovirus</i> .....	113
Вирус мозаики костра <i>Brome mosaic virus</i> .....	114
Вирус мозаики горошка однопарного <i>Vicia unijuga mosaic virus</i> .....	117
Род <i>Cucumovirus</i> .....	119
Вирус огуречной мозаики <i>Cucumber mosaic virus</i> .....	120
Вирус аспермии томатов <i>Tomato aspermy virus</i> .....	168
Вирус задержки роста сои <i>Soybean stunt virus</i> .....	175
Семейство <i>Comoviridae</i> .....	178
Род <i>Comovirus</i> .....	179
Вирус мозаики редиса <i>Radish mosaic virus</i> .....	180
Вирус крапчатости красного клевера <i>Red clover mottle virus</i> .....	182
Род <i>Nepovirus</i> .....	183
Вирус мозаики резухи <i>Arabis mosaic virus</i> .....	184
Вирус короткоузлия винограда <i>Grapevine fanleaf virus</i> .....	185
Вирус кольцевой пятнистости малины <i>Raspberry ringspot virus</i> .....	188
Вирус кольцевой пятнистости табака <i>Tobacco ringspot virus</i> .....	189
Вирус кольцевой пятнистости томата <i>Tomato ringspot virus</i> .....	191
Семейство <i>Potyviridae</i> .....	193
Род <i>Вутовирис</i> .....	197
Род <i>Мацлуравирис</i> .....	198
Род <i>Ипомовирис</i> .....	198

Род <i>Rymovirus</i> .....	199
Род <i>Tritimovirus</i> .....	199
Род <i>Potyvirus</i> .....	200
Вирус обыкновенной мозаики фасоли <i>Bean common mosaic virus</i> .....	203
Вирус желтой мозаики фасоли <i>Bean yellow mosaic virus</i> .....	210
Вирус мозаики гиппеаструма <i>Hippeastrum mosaic virus</i> .....	246
А-вирус картофеля <i>Potato virus A</i> .....	251
У-вирус картофеля <i>Potato virus Y</i> .....	254
Вирус желтой карликовости лука <i>Onion yellow dwarf virus</i> .....	275
Вирус мозаики сои <i>Soybean mosaic virus</i> .....	280
Вирус гравировки табака <i>Tobacco etch virus</i> .....	285
Вирус традесканции белоцветковой <i>Tradescantia albiflora virus</i> .....	290
Вирус мозаики клевера гибридного <i>Trifolium hybridum mosaic virus</i> .....	292
Вирус пестролепестности тюльпана <i>Tulip breaking virus</i> .....	294
Вирус мозаики турнепса <i>Turnip mosaic virus</i> .....	295
Вирус мозаики арбуза 1 <i>Watermelon mosaic virus 1</i> .....	300
Семейство <i>Flexiviridae</i> .....	310
Род <i>Allexivirus</i> .....	310
Х-вирус шалота <i>Shallot virus X</i> .....	311
Род <i>Carlavirus</i> .....	314
Вирус бессимптомности лилии <i>Lily symptomless virus</i> .....	316
М-вирус картофеля <i>Potato virus M</i> .....	316
S-вирус картофеля <i>Potato virus S</i> .....	318
Вирус мозаики горошка ложносочевичного <i>Vicia pseudorobus mosaic virus</i> .....	323
Род <i>Potexvirus</i> .....	324
Вирус кольцевой пятнистости гортензии <i>Hydrangea ringspot virus</i> .....	326
Вирус мозаики подорожника азиатского <i>Plantago asiatica mosaic virus</i> .....	328
Вирус аукуба мозаики картофеля <i>Potato aucuba mosaic virus</i> .....	330
Х-вирус картофеля <i>Potato virus X</i> .....	333
Вирус мозаики белого клевера <i>White clover mosaic virus</i> .....	335
Антигенное родство дальневосточных изолятов потексвирусов .....	337
«Плавающие» роды – не отнесенные к какому-либо определенному семейству .....	342
Род <i>Hordeivirus</i> .....	342
Вирус штриховатой мозаики ячменя <i>Barley stripe mosaic virus</i> .....	343
Род <i>Tenuivirus</i> .....	345
Вирус штриховатости риса <i>Rice stripe virus</i> .....	346
Род <i>Tobamovirus</i> .....	348
Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца <i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> .....	349
Вирус мозаики томата <i>Tomato mosaic virus</i> .....	351
Вирус табачной мозаики <i>Tobacco mosaic virus</i> .....	353
Род <i>Tobravirus</i> .....	388
Вирус погремковости табака <i>Tobacco rattle virus</i> .....	389
Таксономический статус дальневосточных изолятов вирусов растений .....	393
Литература .....	416



## Contents

Preface.....	5
List of abbreviations .....	8
Modern taxonomy and nomenclature of plant viruses.....	12
Family <i>Caulimoviridae</i> .....	36
Genus <i>Caulimovirus</i> .....	37
<i>Cauliflower mosaic virus</i> .....	55
<i>Dahlia mosaic virus</i> .....	71
Family <i>Rhabdoviridae</i> .....	76
Genus <i>Cytorhabdovirus</i> .....	78
<i>Oat pseudorosette virus</i> .....	79
<i>Northern cereal mosaic virus</i> .....	81
Family <i>Luteoviridae</i> .....	88
Genus <i>Luteovirus</i> .....	89
<i>Barley yellow dwarf virus</i> .....	89
Genus <i>Polerovirus</i> .....	94
<i>Potato leafroll virus</i> .....	94
Genus <i>Enamovirus</i> .....	96
<i>Pea enation mosaic virus 1</i> .....	96
Family <i>Tombusviridae</i> .....	98
Genus <i>Necrovirus</i> .....	99
<i>Tobacco necrosis virus</i> .....	100
Family <i>Bromoviridae</i> .....	110
Genus <i>Alfavirus</i> .....	111
<i>Alfalfa mosaic virus</i> .....	111
Genus <i>Bromovirus</i> .....	113
<i>Brome mosaic virus</i> .....	114
<i>Vicia unijuga mosaic virus</i> .....	117
Genus <i>Cucumovirus</i> .....	119
<i>Cucumber mosaic virus</i> .....	120
<i>Tomato aspermy virus</i> .....	168
<i>Soybean stunt virus</i> .....	175
Family <i>Comoviridae</i> .....	178
Genus <i>Comovirus</i> .....	179
<i>Radish mosaic virus</i> .....	180
<i>Red clover mottle virus</i> .....	182
Genus <i>Nepovirus</i> .....	183
<i>Arabis mosaic virus</i> .....	184
<i>Grapevine fanleaf virus</i> .....	185
<i>Raspberry ringspot virus</i> .....	188
<i>Tobacco ringspot virus</i> .....	189
<i>Tomato ringspot virus</i> .....	191
Family <i>Potyviridae</i> .....	193
Genus <i>Bymovirus</i> .....	197
Genus <i>Macluravirus</i> .....	198
Genus <i>Ipomovirus</i> .....	198

Genus <i>Rymovirus</i> .....	199
Genus <i>Tritimovirus</i> .....	199
Genus <i>Potyvirus</i> .....	200
<i>Bean common mosaic virus</i> .....	203
<i>Bean yellow mosaic virus</i> .....	210
<i>Hippeastrum mosaic virus</i> .....	246
<i>Potato virus A</i> .....	251
<i>Potato virus Y</i> .....	254
<i>Onion yellow dwarf mosaic virus</i> .....	275
<i>Soybean mosaic virus</i> .....	280
<i>Tobacco etch virus</i> .....	285
<i>Tradescantia albiflora virus</i> .....	290
<i>Trifolium hybridum mosaic virus</i> .....	292
<i>Tulip breaking virus</i> .....	294
<i>Turnip mosaic virus</i> .....	295
<i>Watermelon mosaic virus 1</i> .....	300
Family <i>Flexiviridae</i> .....	310
Genus <i>Allexivirus</i> .....	310
<i>Shallot virus X</i> .....	311
Genus <i>Carlavirus</i> .....	314
<i>Lily symptomless virus</i> .....	316
<i>Potato virus M</i> .....	316
<i>Potato virus S</i> .....	318
<i>Vicia pseudorobus mosaic virus</i> .....	323
Genus <i>Potexvirus</i> .....	324
<i>Hydrangea ringspot virus</i> .....	326
<i>Plantago asiatica mosaic virus</i> .....	328
<i>Potato aucuba mosaic virus</i> .....	330
<i>Potato virus X</i> .....	333
<i>White clover mosaic virus</i> .....	335
Study of antigenic relationships in the <i>Potexvirus</i> (far-east isolates).....	337
«Swimming» genuses – not take to some definite family.....	342
Genus <i>Hordeivirus</i> .....	342
<i>Barley stripe mosaic virus</i> .....	343
Genus <i>Tenuivirus</i> .....	345
<i>Rice stripe virus</i> .....	346
Genus <i>Tobamovirus</i> .....	348
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> .....	349
<i>Tomato mosaic virus</i> .....	351
<i>Tobacco mosaic virus</i> .....	353
Genus <i>Tobravirus</i> .....	388
<i>Tobacco rattle virus</i> .....	389
Taxonomy status of far-east isolates of plant viruses.....	393
References.....	416