

**ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ЖЁЛТОЙ МОЗАИКИ ФАСОЛИ,
ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СОИ**

В работе представлена сравнительная характеристика биологических, физико-химических и антигенных свойств изолята вируса жёлтой мозаики фасоли (ВЖМФ), выделенного из сои. Полученные результаты свидетельствуют о наличии индивидуальных особенностей выделенного изолята, которые отличают его от свойств типичного штамма ВЖМФ и изолятов, исследованных на Украине другими авторами.

Ключевые слова: *Glucine max (L)*, потивирусы, вирус жёлтой мозаики фасоли (ВЖМФ), реакция двойной диффузии в геле (РДЦ), точка термической инактивации (ТТИ), предельное разведение вируса (ПРВ), период сохранения инфекционности *in vitro* (ПСИ)

Соя выращивается во многих частях мира и является основным источником как пищевого, так и технического растительного масла и белка [6, 7]. Экономике выращивания сои значительный ущерб наносят сорняки, вредители и болезни – насекомые, патогенные грибы, нематоды и вирусы. Вирусы являются глобальными вредителями сои. На Украине вирусные болезни сои встречаются во всех районах ее выращивания. Установлено [12], что в разных областях нашей страны соя поражается преимущественно двумя основными вирусами – вирусом мозаики сои (ВМС) и вирусом жёлтой мозаики фасоли (ВЖМФ). Причём удельный вес потивирусов в смешанной инфекции превалирует как по своей распространённости, так и по вредоносности. Ранее нами [12], путем пассирования инфекционного сока из сои, на растениях-дифференциаторах было получено чистую линию ВЖМФ. Целью данной работы является изучение биологических, физико-химических и антигенных свойств ВЖМФ (изолят Киевский, ВЖМФ-К), выделенного из сои, выращиваемой в Киевской области.

Материалы и методы. Для препаративного выделения и изучения биологических и серологических свойств, изолят ВЖМФ-К накапливали в растениях *Pisum sativum L.* Для выделения вируса инфицированный листья гороха отбирали в момент максимального накопления вирусов – через 14-20 дней после инокуляции. Очистку вируса проводили с использованием метода Hattinga [10].

Изучали биологические и физико-химические свойства выделенного изолята и сравнивали их со свойствами типичного штамма ВЖМФ [8, 11].

Электронно-микроскопические исследования очищенных вирусных препаратов или растительных экстрактов проводили в электронном микроскопе JEM 1400. Препараты контрастировали 1%-ными растворами фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК) или уранил-ацетата.

Электрофорез белков проводили в присутствии 0,1 %-го SDS в вертикальных пластинах с использованием 12 %-го разделяющего и 5 %-го концентрирующего полиакриламидного геля по Лемли [13]. Электрофоретическое разделение белков проводили при комнатной температуре и силе тока 40мА в течение 4 часов.

Для получения антисыворотки к очищенному изоляту ВЖМФ-К, кролики породы Шиншилла были иммунизированы вирусным препаратом, эмульгированным с масляным адьювантом Montanide ISA 25, производства фирмы «SEPPIC», образующим эмульсию обратного типа. Очищенный вирус и масло смешивали в соотношении, рекомендованном производителем адьюванта в течении 5-10 мин и использовали для иммунизации.

Иммунизацию проводили по схеме:

1-ый и 8-ой день – 2 мг иммуногена с адьювантом вводили внутримышечно в заднее бедро кроля;

15-ый день – 2 мг иммуногена – внутрикожно вдоль хребта по боковым линиям;

21-ый день – 0,5 мг иммуногена – внутрикожно вдоль хребта по боковым линиям.

Кровь брали через 30 дней после последней инъекции и выдерживали в течении 1 часа при температуре 37 °С. Титр антисыворотки определяли методом двойной иммунодиффузии

в агаре в модификации Uyemoto et al. [14] (Noble agar, DIFCO Lab., 0,8 % в 0,01 М ФБ, pH 7,0, содержащий 0,04 % азид натрия и 0,5 % SDS).

Результаты и их обсуждение. На Украине исследования штаммового многообразия ВЖМФ на бобовых ранее не проводились вовсе или проводились несистематически. Так, в 1966 году Краевым [5] при исследовании вируса мозаики кормовых бобов был выявлен вариант ВЖМФ, вызывавший обычную мозаику бобов, которая характеризовалась общим хлорозом и желто-зеленой пятнистостью листьев, укорочением верхушечных междоузлий стебля и задержкой роста растений. Симптомы, которые вызывались этим вирусом на восприимчивых растениях и реакция растений-индикаторов были аналогичны описанным в литературе при инфицировании этих растений ВЖМФ [9].

ВЖМФ из сои был выделен также Билык [3] в 1967 году. Этот изолят был отнесен к типичному штамму ВЖМФ. Несколько позже при изучении штаммового состава ВЖМФ на Украине было получено 2 изолята ВЖМФ, распространённых на клевере луговом [1] и 2 изолята – на люпине желтом [2], свойства которых во многом совпадали со свойствами типичного штамма ВЖМФ. Однако выделенные изоляты отличались от типичного штамма и между собой по кругу поражаемых растений-хозяев, характерным симптомам и физическим свойствам.

В 1989 году при обследовании посевов люпина *Lupinus luteus* Жмурко и др. были обнаружены два типа ВЖМФ [4]. Изоляты первого типа вызывали тёмно-зелёную мозаику на фасоли, слабую мозаику – на бобах и горохе, на лебеде *Atriplex hortensis* – очень слабую местную реакцию и резкое системное поражение. Изоляты второго типа на всех исследуемых сортах фасоли, бобов и гороха вызывали четкую мозаику листьев, на мари квиноа *Ch. quinoa* – лишь локальные поражения.

К кругу растений-хозяев ВЖМФ-К, обнаруженного нами [12] на производственных посевах сои в Киевском регионе в 2010 году, относятся растения семейств *Aizoaceae* (*Tetragonia expansa* L.), *Amaranthaceae* (*Gomphrena globosa* L.), *Chenopodiaceae* (*Ch. alba* L., *Ch. amaranticolor* (Coste & A. Reyn.), *C. quinoa* Willd.), *Fabaceae* (*Dolichos biflorus* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Vicia faba* L., *Lupinus luteus*, *Glycine soja* L., *Vigna sinensis* L.), *Solanaceae* (*Petunia hybrida* Villm). То есть, для исследуемого изолята К вируса характерен широкий круг поражаемых им растений, в том числе за пределами семейства бобовых. И наоборот, бессимптомными хозяевами с отрицательной реакцией при обратной инокуляции были: *Cucumis sativus* L. (*Cucurbitaceae*), *Vigna unguiculata* L. (*Leguminosae*), *Lycopersicon esculentum* Mill, *Capsicum annuum* L., *N. tabacum* L., cvs. *Samsun*, *Datura stramonium* L., *Datura metel*, (*Solanaceae*). Типичными штаммами ВЖМФ считают изолят Scott's B-25 и изоляты, выделенные из *Gladiolus* sp. [11]. Данные сравнительного анализа выделенного изолята К и типичного штамма ВЖМФ относительно симптомов на разных индикаторных растениях приведены в табл. 1.

Таблица 1

Реакции разных растений на инфицирование вирусным изолятом и типичным штаммом ВЖМФ*

Вид растения	Характерные вирусные симптомы	
	ВЖМК-К	В-25 (типичный штамм)
<i>Aizoaceae</i>		
<i>Tetragonia expansa</i> L.	Множественные локальные некрозы через 1-2 нед. после инфицирования	Некротичные локальные поражения
<i>Amaranthaceae</i>		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Локальная инфекция, некротичные локальные поражения с розовым краем	Кольцевые некрозы неправильной формы, коричневого или красного цвета
<i>Atriplex hortensis</i> L.	Хлоротичные локальные некрозы	Хлоротичные локальные некрозы
<i>Chenopodiaceae</i>		
<i>Ch. alba</i> L.	Хлоротичные локальные некрозы	Хлоротичные локальные некрозы
<i>Ch. amaranticolor</i> (Coste & A. Reyn.)	Хлоротичные локальные некрозы с краем, системное пожелтение жилок, скручивание листьев	Признанные индикаторы. Через 2 нед. бледно-жёлтые пятна, позже некротизируются. Иногда – системная крапчатость инокул. листьев и отросших
<i>Ch. quinoa</i> Willd.	Хлоротичные локальные некрозы	

Продолжение табл. 1

<i>Fabaceae</i>		
<i>Dolichos biflorus</i> L.	Отставание в росте, некротизация верхушки	–
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Системная жёлтая мозаика, деформации листовой пластинки, некротизация листа, карликовость, пятнистость бобов	Пятнистость. Листовая пластинка ровная. Некротизация верхушки, системная мозаика
<i>Vicia faba</i> L.	Яркая жёлто-зелёная мозаика, системная инфекция, некротизация листьев.	Хлороз жилок, жёлто-зелёная пятнистость, морщинистость и деформации листовой пластинки, системное распространение
<i>Lupinus luteus</i>	Некротичные локальные поражения	Узкие, слегка деформированные листья, системная мозаика.
<i>Glycine soja</i> L.	Жёлтая пятнистость всей листовой пластинки	Системная мозаика
<i>Pisum sativum</i> L.	Системное поражение	Некротизация верхушки, системная мозаика
<i>Malvaceae</i>		
<i>Abelmoschus esculentus</i> (бамия)	Системное поражение	-
<i>Trifolium repens</i> L., (Fabaceae), <i>Cucumis sativum</i> L. (Cucurbitaceae), <i>Nicotiana glutinosa</i> L., <i>N. rustica</i> L. (Solanaceae), <i>Vigna sinensis</i> L. (Leguminosae) были нечувствительными к вирусу.		

*- при механической инокуляции растений в условиях теплицы

При сравнительном анализе круга растений-хозяев было установлено, что исследуемый изолят несколько отличался от типичного штамма и изолятов, выявленных в Украине ранее. В частности, на бобах вирус вызывал резкую мозаику в виде яркой жёлтой пятнистости и местных некрозов, в которых вирусная инфекция не локализовалась. Данные симптомы для ВЖМФ в Украине ранее не наблюдались. В отличие от украинских штаммов, описанных в предыдущие годы, изолят К вызывал некротизацию всей листовой пластинки фасоли и системную крапчатость, более выраженную, чем крапчатость, индуцированную типичным штаммом. Однако К-изолят не вызывал локальной инфекции на табаке и махорке, характерной для некротических штаммов ВЖМФ. Поэтому выделенный изолят можно отнести к группе среднепатогенных. В то же время, экспериментальный круг растений-хозяев данного изолята значительно шире и включает растения из семейств Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae и Malvaceae.

Изучение физических свойств вируса. Вирус достаточно устойчив к воздействию повышенной температуры и условиям хранения. Так, сок из листьев растений *Vicia faba* сохранял инфекционные свойства при температуре 60°C, а при 65°C – терял их. При комнатной температуре вирус сохранял инфекционность в соке бобов в течение 2-3 суток. Однако в присутствии антисептика азида натрия при +4°C вирус сохранял свои свойства около 2 месяцев. Вирус накапливается в растениях *Vicia faba* в достаточно высокой концентрации: инфекционность изолята К терялась при разведении сока в 10⁻⁴ – 10⁻⁵ раз (табл. 2).

Таблица 2

Физические свойства вирусного изолята

Критерии	Инфекционность на <i>Chenopodium amaranticolor</i>								
	25*	50	55	60	65	70	75	80	°C
ТТИ	+++	+++	++	+	+	00	00	00	
ПРВ	10*	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Разведение
ПСИ	0*	1	2	3	4	5	6	7	Дни
	+++	+++	++	+	00	00	00	00	

*- контроль; ТТИ – точка термической инактивации, ПРВ – предельное разведение вируса, ПСИ – период сохранения инфекционности; количество локальных некрозов: +++ – значительное; ++ – умеренное; + – единичные некрозы

При очистке выделенного вируса методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, в опалесцирующей зоне градиентной колонки на расстоянии 3 мм от мениска были обнаружены вирусные частицы без примесей растительных белков (рис. 1). Очищенный препарат имел типичный для нуклеопротеидов спектр поглощения в ультрафиолетовом свете с минимумом 245 нм и максимумом 260 нм. Соотношение $A_{260/280}$ составляло 1,3. Специфический коэффициент поглощения $E_{0,1\%}^{260} = 2,4$. Исследования очищенных препаратов вируса в электронном микроскопе показало наличие длинных изогнутых вирусных частиц нитевидной формы 700-760 нм длиной. Полученные препараты вируса сохраняли высокую инфекционность, имели удовлетворительную степень очистки и концентрацию, необходимые для получения специфической антисыворотки.

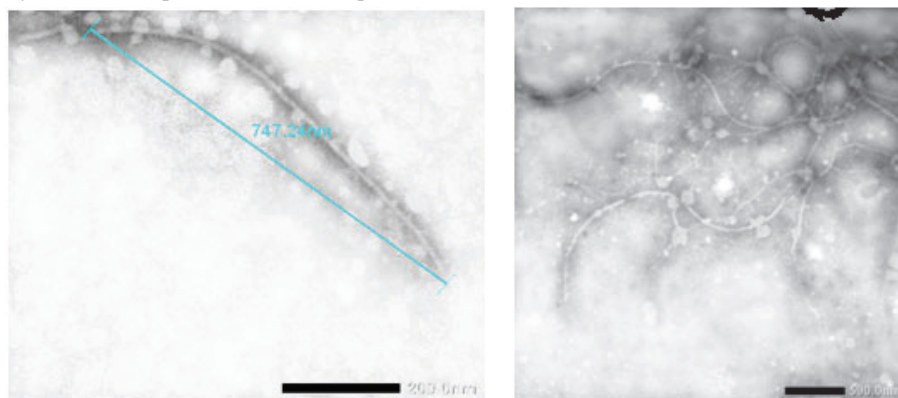


Рис. 1. Электронограмма ВЖМФ-К. Контрастирование 2 %-ным раствором ФВК.

Отсутствие ВМС в вирусном препарате было подтверждено методом ИФА с использованием диагностического набора для определения ВМС («Agdia»).

Электрофоретический анализ белкового компонента показал (рис. 2), что в препаратах ВЖМФ присутствует 1 полипептид с Мг 34 кДа.

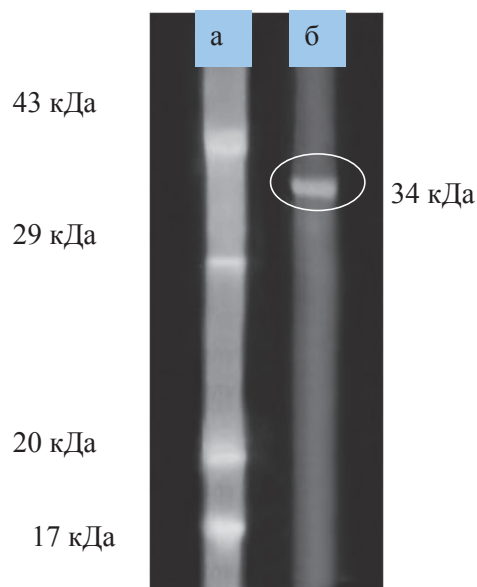


Рис. 2. Электрофореграмма капсидного белка ФЖМФ-К. а – маркеры, б – вирусный препарат

Физико-химические свойства вирионов исследуемого изолята ВЖМФ несколько отличались от свойств типового штамма В-25 и изолятов, выявленных и исследованных в Украине в предыдущие годы (табл. 3).

Таблица 3

Физические свойства некоторых вирусных изолятов ВЖМФ

Вирус	ТТІ	ГРС	Вист., дней	Длина частичек, нм	Мг капсидного белка, кДа	Автор, год
Исследуемый изолят	70	1:10000	2-3	750	34	Кириченко, Коваленко, Краева, 2010
Изолят из сои	58	1:4000	2	-	-	Билык, 1967
Изолят из клевера	55-60	1:2000	2	750	-	Баратова, 1970
Изолят из люпина I	50	1:1000	1-2	750	-	Баратова, 1971
Изолят из люпина II	65	1:2000	1	750	-	
Изолят из люпина I	55-60	1:800	3	755-760	33,4	Жмурко, Молчанец, Порембская, 1989
Изолят из люпина II	60-65	1:2000	2	770	36,9	
Типичный штамм В-25	65	1:1000 -1:10000	2-7	750	33-35	ICTV 57.0.1.0.009

Реакцию двойной иммунодиффузии в геле проводили с антигеном (инфекционный сок или препарат вируса) в разведении 1:16. Для деградации вириона на фрагменты использовали 3 %-ный раствор SDS. При воздействии SDS фрагменты вирусных частиц были способны проникать сквозь поры агара и взаимодействовать со специфическими антителами. Причем, 0,5 %-ный раствора SDS, входившего в состав агара, было достаточно для деградации вируса в случае использования очищенного вирусного препарата в качестве антигена. Рабочее разведение сыворотки составляло 1:16 – 1:32. Используемая нами схема иммунизации позволила получить поликлональные антитела с невысоким титром, который составлял 1:32 – 1:64 в РДД, то есть выделенный вирус не проявлял высокой иммуногенной и антигенной активности.

Таким образом, результаты, полученные при изучении биологических, физическо-химических и антигенных свойств изолята ВЖМФ-К из сои свидетельствуют о наличии его индивидуальных особенностей, которые отличаются от свойств типичного штамма ВЖМФ и изолятов этого вируса, исследованных на Украине ранее другими авторами.

А.М. Кириченко

Институт мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ЖОВТОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ, ВИДІЛЕНОГО ІЗ СОЇ

Резюме

В роботі представлена порівняльна характеристика біологічних, фізико-хімічних і антигенних властивостей ізоляту вірусу жовтої мозаїки квасолі (ВЖМК), виділеного із сої. Одержані результати свідчать про наявність індивідуальних особливостей виділеного ізоляту, які відрізняють його від властивостей типового штаму ВЖМК і ізолятів, досліджених на Україні раніше іншими авторами.

Ключові слова: *Glycine max* (L), потівіруси, вірус мозаїки сої (ВМС), вірус жовтої мозаїки квасолі (ВЖМК), реакція подвійної дифузії в гелі (РПД), точка температурної інактивації (ТТІ), граничне розведення вірусу (ГРВ), період збереження інфекційності in vitro (ПЗІ).

Kyrychenko A.M.

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE CHARACTERIZATION OF BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS ISOLATED FROM SOYBEAN

S u m m a r y

The comparative characteristics of biological, physico-chemical and antigenic properties of bean yellow mosaic virus isolated from soybeans are shown. The obtained results indicate the existence of individual properties of the isolate which help to distinguish it from the typical strains and isolates studied previously in Ukraine by other authors.

The paper is presented in Russian.

K e y w o r d s: *Glycine max* (L), Potyviridae, soybean mosaic virus (SMV), bean yellow mosaic virus (BYMV), gel double diffusion (GDD), thermal inactivation point (TIP), dilution end point (DEP), longevity in vitro (LIV).

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: Kyrychenko A.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. *Баратова П.Ф.* Про властивості ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі із конюшини // Мікробіол. журн. – 1970. – С. 114–116.
2. *Баратова П.Ф.* Про властивості ізолятів вірусу жовтої мозаїки квасолі виділених з люпину жовтого // Мікробіол. журн. – 1971. – С. 267–269.
3. *Бильк Л.Г.* Мозаика сои на Украине: Автореф. дис... канд. наук. – Киев, 1967.
4. *Жмурко Л.И., Молчанец О.В., Порембская Н.Б.* Изоляты вируса жёлтой мозаики фасоли, поражающего кормовой люпин в условиях Украины // 7-й Съезд украинского микробиологического общества, часть 2. – Черновцы – 1989. – С. 171–72.
5. *Краев В.Г.* Вирусы мозаики кормовых бобов на Украине: Автореф. дис. ... канд. наук. – Киев, 1966.
6. *Endres J.* Niche marketing for new oilseeds: An industrial perspective. – MacKenzie S.L., Taylor D.C. Seed Oils for the Future. – 1992. – P. 1–8.
7. *Endres J.* Soy Protein Products Characteristics, Nutritional Aspects and Utilization. – Champaign, IL: AOCS Press, 2001.
8. *Fox R.T.V.* Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology. – UK: CAB International Publ., 1993.
9. *Goodchild D.J.* Relationships of legume viruses in Australia. 1. Strains of bean yellow mosaic virus and pea mosaic virus // Aust. J. Biol. Sci. – 1956a. – 9. – P. 213–230.
10. *Hattinga H.* Properties of viruses of the potyvirus group. 1. A simple method to purify bean yellow mosaic virus, pea mosaic virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y // Neth. J. Pl. Path. – 1973. – 79. – P. 125–129.
11. *ICTVdB: Bean yellow mosaic virus.* – ICTVdB – The Universal Virus Database. – Version 4 / Ed by Buchen-Osmond C. – New York, USA: Columbia University, 2006.
12. *Kyrychenko A.M., Kraeva G.V., Kovalenko O.G.* Biological characteristic and identification of soybean viruses isolated from different Ukrainian regions // (in press).
13. *Laemmli U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
14. *Uyemoto J.K., Prowidenti R., Shroeder W.T.* Serological relationship and detection of bean common and bean yellow mosaic viruses in agar gel // Ann. Appl. Biol. – 1972. – 71. – P. 235–242.

Отримано 24.10.2012