

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ДИАГНОСТИКА И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИРУСОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР В АГРОЦЕНОЗАХ БАССЕЙНА РЕКИ АМУР (ХАБАРОВСКИЙ КРАЙ)

Р.В. Гнутова, В.Ф. Толкач, И.Б. Несмелов

Биолого-почвенный институт ДВО РАН,  
690022, Владивосток, Проспект 100-летия, 159, mail: girina.vl@mail.ru, ibss@eastnet.febras.ru

Представлены результаты идентификации вирусов желтой мозаики фасоли и огуречной мозаики, поражающие бобовые и тыквенные овощные культуры. Рассмотрена возможность использования 2b гена ВОМ в качестве маркера для ПЦР-диагностики. Изучение нуклеотидных последовательностей изолятов ВОМ и сравнительный филогенетический анализ с изолятами из GenBank показали, что хабаровские изоляты ВОМ входят в субгруппу IA группы I.

**Ключевые слова:** вирусы растений, мониторинг, идентификация, ПЦР-диагностика, 2b ген, филогенетический анализ.

## IDENTIFICATION, DIAGNOSTIC AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF VIRUSES VEGETABLE CROPS IN AGROCENOSSES AMUR RIVER BASIN (Khabarovsk Territory)

R.V. Gnutova, V.F. Tolkach, I.B. Nesmelov

Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS,  
690022, Vladivostok, 100-letia Vladivostok, Pr. 159, e-mail: girina.vl@mail.ru; ibss@eastnet.febras.ru

The results of identification of viruses *Bean yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*, identified from vegetable legumes culturales and pumpkin vegetable plants. The possibility of using 2b gene of CMV as a marker for PCR diagnostics. The study of nucleotide sequences of isolates of CMV and comparative phylogenetic analyses of isolates from GenBank, showed that the Khabarovsk isolates of CMV consists of subgroup in the IA group I.

**Key words:** plant viruses, monitoring, identification, PCR-diagnostic, 2b gene, phylogenetic analysis.

### ВВЕДЕНИЕ

Огромный по территории Дальний Восток России до сих пор остается малоизученным по видовому составу вирусов растений, их распространенности и вредоносности.

Идентификация вирусов, исследование их эпидемиологических характеристик (происхождение, пути распространения, взаимодействие с другими объектами сообществ) необходимы для разработки мероприятий по защите агроценозов от вирусных болезней. Фитосанитарный мониторинг по выявлению вирусных инфекций на растениях, проведенный нами в 2003–2008 гг., показал, что в средней части бассейна р. Амур (Хабаровский край) довольно высока степень поражения вирусами различных сельскохозяйственных культур. Подобные исследования позволяют получить не только новые данные о разнообразии вирусов растений в Дальневосточном регионе, но и изучить географию распространения вирусных инфекций на Востоке России.

За годы обследования посадок овощных культур в Дальневосточном регионе нами показано, что наиболее опасными и распространенными в южных ре-

гионах для них являются вирусы табачной (ВТМ) и огуречной мозаики (ВОМ), а в последние годы все чаще на сельскохозяйственных растениях и на сорной растительности стал встречаться вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ). Ранее на овощных, декоративных, плодово-ягодных культурах и картофеле были выявлены и изучены биологические и антигенные свойства около 40 изолятов ВОМ, более 30 – ВТМ и более 10 – ВЖМФ (Гнутова, 2009, 2011; Толкач, Гнутова, 2008, 2011а,б). Нередко ВОМ встречался вместе с ВТМ. В таком случае потери урожая овощных культур были довольно существенными и составляли иногда от 80 до 100 %. Известно, что степень вредоносности вируса во многом зависит от восприимчивости культивируемого сорта.

Основная цель исследований – выявление наиболее опасных и распространенных вирусов, поражающих овощные культуры в бассейне р. Амур, ПЦР-диагностика с использованием 2b гена ВОМ в качестве маркера и филогенетический анализ хабаровских изолятов ВОМ по нуклеотидным последовательностям для их классификации.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом исследования послужили образцы растений томатов, перцев, тыквы, арбузов, баклажанов, кабачков, свеклы, бобов, фасоли и других овощных культур, а также сорных и диких растений с вирусоподобными симптомами, главным образом семейств Бобовых, Тыквенных и Пасленовых, обнаруженных во время фитосанитарного мониторинга в различных районах Хабаровского края.

Биологические методы исследований включали изучение круга растений-хозяев и симптоматологию заболеваний. Поскольку круг растений-хозяев и их ответная реакция на инфекцию являются результатом работы вирусного генома и его взаимодействия с растением, использовали виды и сорта растений различных семейств. При проведении биологического тестирования применяли собственную модификацию экспериментального подбора растений-индикаторов в тепличных условиях. Морфологию вирионов исследовали с помощью электронного микроскопа на негативно-окрашенных препаратах, которые готовили методом погружения, а вирусные включения в клетках инфицированных вирусом растений выявляли с помощью светового микроскопа. В качестве переносчика вируса использовали тлю персиковую *Myzus persicae* Sulz. Для исследования семенной передачи брали семена различных растений. Антигенное родство изу-

чаемых изолятов вирусов определяли в реакции двойной иммунодиффузии (РДД) с использованием 1%-го Бактоагара в 0.15 М растворе хлористого натрия с добавлением 1.5%-го ПЭГ (м.м. 6000) (Гнутова, 1993).

Суммарную РНК для обратной транскрипции (ОТ) выделяли из листьев табака, пораженных изолятами ВОМ (Bekesiova et al., 1999). Параметры смеси для ОТ были следующие: 1 мкл 2.5 мМ dNTPmix (СибЭнзим, Россия), 1 мкл гексонуклеотидного рендом-праймера, 1 мкл 10X реакционного буфера (Silex, Россия), 1 мкл РНК, 0.4 мкл (12.5 еа/мкл) M-MLV ревертазы (Silex, Россия) и воды до 10 мкл. Термический цикл: 70 °С – 10 мин, 25 °С – 10 мин, 37 °С – 1 ч, 70 °С – 10 мин. Завершалась реакция охлаждением до 4 °С.

Реакционная смесь ПЦР: 1 мкл кДНК, 2 мкл 10X реакционного буфера (СибЭнзим, Россия), праймеры к 2b гену до 10 пкМ (Syntol, Россия) (см. таблицу), 0.4 еа Taq ДНК-полимераза (СибЭнзим, Россия), 1.2 мкл 2.5 мМ dNTPmix (СибЭнзим, Россия), воды до 20 мкл. Условия реакции ПЦР: 95 °С – 5 мин (95 °С – 30 с, 48 °С – 30 с, 72 °С – 40 с); 35 циклов, затем охлаждали до 4 °С. Реакцию проводили на приборе T3 Thermocycler (Biometra, Германия).

Секвенирование выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 310 на базе Биолого-почвенного института ДВО РАН. Реакцию секвенирования проводили в смеси, включавшей в себя 1 мкл ПЦР-продукта, 1 пкМ праймера, 2.5 мкл BigDye Terminator v. 3.1, при следующих условиях: 95 °С – 1 мин (95 °С – 30 с, 50 °С – 15 с, 60 °С – 4 мин); 25 циклов. Очистка продукта включала в себя осаждение 70%-м этанолом.

Для филогенетического анализа применяли методы NJ, MP и UPGMA при поддержке бутстреп-метода. Анализ проводили с использованием программного пакета MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011)

Структура праймеров к гену 2b ВОМ

Праймер	5'-3'-последовательность	Количество нуклеотидов, н	Температура анилинга, °С
L	ACA-AAA-GTC-CCA-GCG-AGA-GA	20	48
R	CCA-TTC-GTT-ACC-AGC-AAA-CC	20	

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Во время проведения фитосанитарного мониторинга (2000–2011 гг.) отмечено увеличение в ценозах бассейна р. Амур число растений, пораженных вирусами. Причина – отсутствие должного контроля со стороны карантинной инспекции за овощной продукцией, поступающей из Китая, с которой могут быть завезены вирусы на территорию края. Кроме того, например, в 2008 г. фитосанитарная ситуация усугубилась нашествием полевого мотылька, гусеницы которого поедали во время активной вегетации растения, не только культурные (соя, овощные, декоративные и др.), но и сорные. Это “смазывало” картину поражения их фитопатогенами. Известно, насекомые распространяют вирусы в летний период с сорных и диких растений на культурные. Поэтому особое внимание во время фитосанитарного мониторинга уделялось выявлению очагов вирусной инфекции в биоценозах.

### Идентификация возбудителей вирусной инфекции из тыквенных овощных культур

Из растений дыни *Cucumis melo* L. и огурца полевного *Cucumis sativus* L., выращиваемых в открытом грунте, нами был идентифицирован вирус огуречной мозаики. Ранее этот вирус мы обнаружили на растениях тыквы крупноплодной *Cucurbita maxima* Duch. с симптомами задержки роста растений (окрестности г. Хабаровска) и томате *Lycopersicon esculentum* Mill. сорта Красный великан (Толкач, Гнутова, 2008). По биологическим свойствам эти два хабаровских изолята незначительно отличались от изолятов ВОМ, обнаруженных на овощных культурах в Приморском крае (Толкач, Гнутова, 2011а), и от обычного штамма ВОМ, описанного в литературе (Brunt et al., 1997). В Приморском крае ВОМ поражал томаты, огурцы, перцы, репе арбузы, кабачки, патиссоны, баклажаны, тыкву.

**Изолят из дыни (ВОМд)** выявлен с симптомами яркой хлоротичной крапчатости. При определении круга растений-хозяев ВОМд заражали 52 вида и сорта растений семейств *Amaranthaceae* Juss., *Asteraceae* Dum., *Balzanaceae* A. Rich., *Chenopodiaceae* Vent., *Cucurbitaceae* Juss., *Fabaceae* Lindl., *Solanaceae* Juss., *Scrophulariaceae* Juss., *Umbelliferae* Juss. Заразились ВОМд 11 видов и сортов растений из семейств *Cucurbitaceae* и *Solanaceae*. Определены физические свойства вирионов изолята ВОМ из дыни: точка термической инактивации (ТТИ) – 45–50 °С, предельное разведение сока (ПРС) –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  и предельное сохранение инфекционности вируса в соке *in vitro* (ПСИ) – около 1 сут.

Получена положительная реакция в РДД изучаемого изолята с антисывороткой против огуречного изолята ВОМ (приморский изолят), что свидетельствовало о принадлежности ВОМд к роду *Cucumovirus*.

Вирус легко передавался механически и тлями *M. persicae* с больных растений на здоровые.

На основании полученных данных по биологическим и антигенным свойствам (симптомам заболевания на тест-растениях, результатам РДД и неперсистентной передачи вируса *M. persicae*) можно сделать вывод, что заболевание на дыне вызывает вирус огуречной мозаики *Cucumber mosaic virus* (CMV) из рода *Cucumovirus* сем. *Bromoviridae*.

**Изолят из огурца (ВОМо)** несколько отличался по биологическим и антигенным свойствам от изученного ранее хабаровского тыквенного изолята (Толкач, Гнutowa, 2008). Особенность заключалась и в более высокой стабильности по сравнению с другим новым изолятом ВОМд. ВОМо по физическим свойствам вирионов имел следующие показатели: ТТИ – 70–75 °С, ПРС –  $10^{-4}$ – $10^{-5}$ , ПСИ – 2 сут. Различия между ВОМо и ВОМд отмечены нами и по восприимчивости и симптоматике заражаемых тест-растений. Если ВОМд удалось заразить 11, то ВОМо около 30 видов и сортов растений семейств *Cucurbitaceae*, *Solanaceae* и *Scrophulariaceae*. В то же время в РДД все дальневосточные тыквенные овощные изоляты формировали идентичные полосы преципитации с антителами к приморскому огуречному изоляту ВОМ, что свидетельствовало о наличии идентичных видоспецифических эпитопов капсидных белков у них. В 90-е годы прошлого столетия дальневосточные изоляты ВОМ выделили в отдельный дальневосточный серотип по результатам иммунохимического анализа, а по биологическим свойствам отнесли к обычному штамму ВОМ (Гнutowa, 1993). Точная диагностика вирусов в настоящее время стала возможна при использовании наряду с высокочувствительными иммунохимическими молекулярными методами.

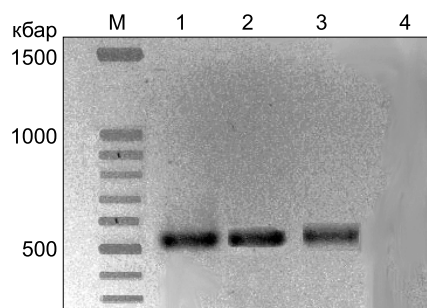
По современной международной классификации, основанной на родственных антигенных взаимоотношениях

капсидных белков изолятов ВОМ и нуклеотидной последовательности гена белка оболочки (ГБО), мировая популяция ВОМ разделена на две группы – I и II. В свою очередь группа I разделяется на субгруппы IA, IB (Palukaitis et al., 1992; Roossinck, 2002; Lin et al., 2003; Lin et al., 2009). В последние годы нами активно изучается нуклеотидная последовательность дальневосточных изолятов ВОМ, в том числе и хабаровских, для определения их групповой принадлежности в мировой классификации.

Использование ГБО в качестве универсального маркера для диагностики, как это делается для многих вирусов растений, мы считаем спорным в связи с высокой изменчивостью гена ВОМ. Именно поэтому мы выбрали другой вариант для ПЦР-диагностики с целью выявления дальневосточных изолятов ВОМ. Совместно с коллегами из ИСХБ РАСХН были сконструированы праймеры к гену-супрессору посттранскрипционного сайленсинга (*2b*) (Gnutova et al., 2010). При этом принималось во внимание, что аминокислотная последовательность белка данного гена имеет наибольшие различия между видами рода *Cucumovirus* (Roossinck, 2002). Кроме того, *2b* ген обладает меньшим размером по сравнению с ГБО (см. таблицу). К тому же этот ген параллельно мы использовали для построения филогенетических реконструкций с целью определения групповой принадлежности изучаемых хабаровских овощных изолятов ВОМ.

По результатам ПЦР у тыквенных изолятов ВОМ был получен фрагмент длиной около 500 п.н. (рис. 1). В качестве контроля использовали суммарную РНК здорового растения табака *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi. Длина секвенированного фрагмента составила 332 п.н. Полученный результат, вероятнее всего, связан с наличием у изучаемых изолятов ВОМ делеции триплета AAG после позиции 271 п.н.

Нами проведено сравнение изучаемых изолятов ВОМ по нуклеотидным последовательностям с 37 изолятами ВОМ, депонированными в GenBank. У хабаровских овощных изолятов ВОМ р-дистанция по гену *2b* составила 0.01. Наиболее близки к ним оказались



**Рис. 1.** Электрофореграмма продуктов ПЦР со специфическими праймерами к *2b* гену ВОМ:

M – ДНК-маркер 100bp + 1.5 Kb; 1 – ВОМд, 2 – ВОМо, 3 – ВОМтыквы; 4 – контроль.



изоляты ВОМ из Японии (42СМ, РF), Испании (Рi-8), Англии (Fny) и Венгрии (Rs, Ns), где р-дистанции составили 0.06–0.05.

Филогенетические деревья, построенные методами NJ, MP и UPGMA, показали сходную топологию (рис. 2). Анализируемые нуклеотидные последовательности распределялись в два кластера – I и II. В свою очередь кластер I разбивался на два подкластера – IA и IB, что соответствует международной классификации изолятов ВОМ (Palukaitis et al., 1992; Roossinck, 2002; Lin et al., 2003; Lin et al., 2009). В качестве внешней группы использовали два других кукумовируса: вирус аспермии томата *Tomato aspermy virus* (BAT, TAV) и вирус задержки роста арахиса *Peanut stunt virus* (ВЗРА, PSV).

В подкластере IA вошли хабаровские овощные изоляты ВОМ, изоляты из Восточной Азии, главным образом из Китая и Японии, а также некоторые изоляты из европейских стран – Нидерландов, Венгрии, Испании и Великобритании.

Таким образом, нами показана возможность использования *2b* гена ВОМ в качестве маркера для ПЦР-диагностики. Кроме того, результаты исследования нуклеотидных последовательностей хабаровских изолятов ВОМ подтвердили наши данные при отнесении их к обычному штамму ВОМ группы I по биологическим и антигенным свойствам, а данные, полученные по изучению их нуклеотидных последовательностей, – к подгруппе IA. Изоляты ВОМ подгруппы IA самые распространенные по всему миру.

Итак, по результатам фитосанитарного мониторинга в Хабаровском крае ВОМ чаще всего поражал овощные тыквенные культуры открытого грунта. Нами выявлены сорта овощных культур из семейств *Solanaceae* и *Cucurbitaceae* как устойчивые, так и восприимчивые к изученным изолятам ВОМ. Устойчивые сорта можно рекомендовать овощеводам для районирования в Хабаровском крае. Не выявлен ВОМ на капусте, хрене, салате и петрушке (Толкач, Гнутава, 2003, 2008).

Следовательно, результаты по идентификации, диагностике и филогенетическому анализу ранее не изученных хабаровских изолятов ВОМ позволили получить новые данные не только о видовом составе, но и о видовом разнообразии и распространении этого вируса в долине р. Амур и в окрестностях, прилегающих к г. Хабаровску.

#### **Идентификация возбудителей вирусной инфекции из бобовых овощных культур**

В последние годы на Дальнем Востоке продолжают исследования по изучению вирусов, распространенных на бобовых растениях как дикой, так и культурной флоры. Помимо Приморского края, нами обследованы бобовые растения в ценозах на наличие вирусов в Сахалинской и Камчатской областях, а также в Хабаровском крае.

**Изолят ВЖМФ из фасоли обыкновенной *Phaseolus vulgaris* L.** был обнаружен на растениях с вирусоподобными симптомами – хлороз жилок листа. При определении круга растений-хозяев из используемых тест-растений инфекция передавалась только на растения двух семейств *Chenopodiaceae* и *Fabaceae*. Из бобовых растений заражались пажитник сенный *Trigonella foenum-graecum* L., горох посевной *Pisum sativum* (L.) Cov. сорта Сахарный и фасоль сортов – Изумрудная, Michelite и Cafeton, не заражались у фасоли сорта – Пионерская, Сапфир фиолетовый, Московская белая, Голубка, Red Kidney и Top crop.

Помимо механической передачи, вирус легко передавался тлей *Myzus persicae* непersistентным способом. Для изучения семенной передачи заражали изучаемым изолятом вируса растения фасоли золотистой *Ph. aureus* Roxb. (тестировано 22 боба), *Ph. vulgaris* сорта Cafeton (5 бобов), *P. sativum* сорта Сахарный (32 боба) и бобы конские *Faba bona* Medic. (23 боба). Визуально симптомов вирусного поражения на сеянцах не выявлено.

Вирусных частиц не обнаружено и при просмотре молодых листьев сеянцев под электронным микроскопом, что указывало на отсутствие семенной передачи у изучаемого изолята вируса.

Вирус в клетках пораженных растений образовывал околядерные Х-тела, о чем свидетельствовали результаты по их обнаружению под световым микроскопом в эпидермисе листьев инфицированных растений *F. bona*. В электронном микроскопе выявлены нитевидные частицы размером 750–800 нм.

Изучены физические свойства вирионов: ТТИ – 70 °С, ПРС –  $10^{-1}$ – $10^{-2}$ , ПСИ – 1 сут.

По результатам реакции иммунодиффузии установлено антигенное родство капсидных белков исследуемого вируса с вирусами рода *Potyvirus* (мозаики арбуза, гравировки табака, желтой мозаики фасоли и Y-вирусом картофеля).

На основании литературных данных и изученных нами свойств оказалось, что вирусная инфекция на фасоли обыкновенной в Хабаровском крае вызывалась вирусом желтой мозаики фасоли *Bean yellow mosaic virus* (род *Potyvirus* семейство *Potyviridae*).

**Изолят ВЖМФ из бобов конских** обнаружен в Хабаровском крае (пригород г. Комсомольска-на-Амуре, пос. Пивань). В препарате, приготовленном из листьев пораженных бобов, в электронном микроскопе выявлены нитевидные частицы размером около 700–720 нм. В световом микроскопе в эпидермисе листа бобов с симптомами вирусного поражения найдены околядерные включения, характерные для вирусов рода *Potyvirus*.

При изучении круга растений-хозяев вируса использовали 24 вида и сорта растений из семейств *Chenopodiaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Solanaceae*. Восприимчивыми к заражению оказались только 3 вида растений из семейства *Fabaceae*. Это растения

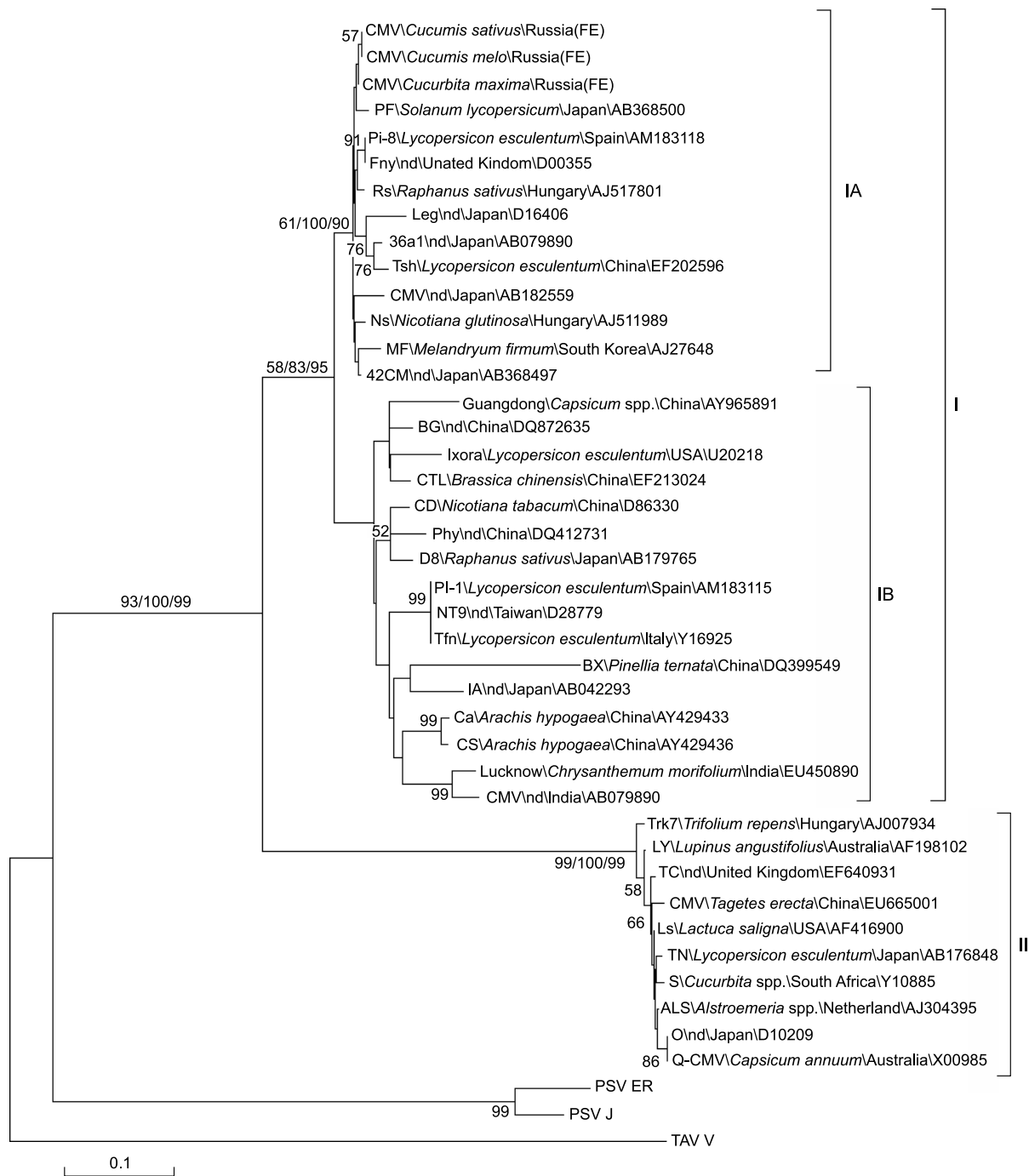


Рис. 2. Филогенетическое дерево, по обобщенным результатам методов NJ/UPGMA/MP.

FE – изоляты из Хабаровского края. Значения ниже 50 не показаны.

*F. bona*, реагирующие на заражение вирусом хлоротичной крапчатостью верхних листьев, позднее на листьях развивалась хлоротичная штриховатость, которая со временем становилась ярче. Симптомы вирусного поражения на *Melilotus albus* Desr. и *Tr. foenum-graecum* проявлялись на 7–8 день в виде яркого хлороза жилок.

Вирус легко передавался непersistентным способом тлей *Myzus persicae* с больного *F. bona* на здоровые растения – *Tr. foenum-graecum* и *F. bona* и механи-

чески. Не выявлено передачи вируса через семена *F. bona* (высажено 19 бобов), *M. albus* (32 семени), *P. sativum* сорт Сахарный (6 бобов). Визуально симптомов вирусного поражения на сеянцах не выявлено.

Определены физические свойства вирионов изучаемого изолята вируса: ТТИ – 50–55 °С, ПРС –  $10^{-3}$ – $10^{-4}$ , ПСИ – 1 сут.

В РДД изучаемый вирус реагировал с антисыворотками против вирусов рода *Potyvirus* (мозаики арбуза, гравировки табака, Y-вируса картофеля и жел-

той мозаики фасоли), что свидетельствовало об их антигенном родстве.

В естественных условиях бобы конские поражаются вирусами: крапчатости бобов (*Broad bean mottle virus* род *Bromovirus*); некроза бобов (*Broad bean necrosis virus* род *Furovirus*); сурового хлороза бобов (*Broad bean severe chlorosis* род *Closterovirus*); окрашивания бобов (*Broad bean stain* род *Comovirus*); настоящей мозаики бобов (*Broad bean true mosaic* род *Comovirus*); увядания бобов (*Broad bean wild* род *Fabavirus*), пожелтение жилок бобов (*Broad bean yellow vein* род *Cytorhabdovirus*), а также вирусами рода *Potyvirus* – желтой кольцевой пятнистости бобов (*Broad*

*bean yellow ringspot virus*) и желтой мозаики фасоли (*Bean yellow mosaic virus*). Вирус, выявленный на бобах конских, на основании изученных свойств и литературных данных идентифицирован нами как вирус желтой мозаики фасоли.

Таким образом, впервые в Хабаровском крае на бобовых овощных растениях фасоли обыкновенной и бобах конских выявлен вирус желтой мозаики фасоли. Дальнейшие исследования по изучению популяции этого вируса на Дальнем Востоке будут связаны со сравнительным филогенетическим анализом дальневосточных изолятов ВЖМФ, депонированных в GenBank.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вирус желтой мозаики фасоли – полифаг – распространен по всему миру. Для него характерен широкий круг поражаемых растений. Из 135 видов, восприимчивых к ВЖМФ, 121 относится к семейству *Fabaceae* (цит. по: Гнутова, 2009). Таким образом, вирус является одним из самых распространенных на бобовых растениях и способен вызывать их массовое заболевание. В мире известно более 30 вирусов, поражающих растения сем. *Fabaceae*, на Дальнем Востоке России идентифицировано около 10 (Гнутова, Золоторева, 2011). Наши исследования свидетельствуют о распространении на юге Дальневосточного региона ВЖМФ на бобовых овощных культурах. В результате фитосанитарного мониторинга овощных культур в бассейне р. Амур в Хабаровском крае вирус выявили на бобах конских и фасоли обыкновенной, а ранее в Приморском крае – на фасоли обыкновенной, клевере гибридном *Trifolium hybridum* L., горохе посевном, клевере красном *Tr. pratense* L. и бобах конских. Причем дальневосточные бобовые овощные изоляты ВЖМФ по биологическим и антигенным свойствам были близки между собой, но главная их особенность заключалась в том, что в отличие от других, описанных в литературе изолятов ВЖМФ, они имеют узкий круг поражаемых растений (Толкач, Гнутова, 2011б).

Из пяти родов, входящих в семейство *Bromoviridae*, на Дальнем Востоке России выявлены вирусы трех родов: *Bromovirus*, *Alfamovirus* и *Cucumovirus*. Из рода *Cucumovirus* изучены *Tomato aspermy virus* – изолят из хризантем, обнаруженный в Приморском и Хабаровском краях (Чуян, Крылов, 1979), и *Cucumber mosaic virus* (Толкач, Гнутова, 2003). Все дальневосточные овощные изоляты ВОМ оказались слабыми иммуногенами, но проявляли близкое антигенное родство между собой. Они не распространяются с помощью семян, но хорошо передаются тлями и механически; по антигенным свойствам мы отнесли их к дальневосточному серотипу, так как они не реагировали с антисыворотками, полученными к европейским изолятам ВОМ. В этой работе мы показали возможность использования *2b* гена ВОМ в качестве маркера для ПЦР-диагностики. Кроме того, результаты исследования нуклеотидных последовательностей хабаровских изолятов ВОМ подтвердили наши данные по биологическим и антигенным свойствам при отнесении их к обычному штамму ВОМ группы I. Изучение разнообразия нуклеотидных последовательностей хабаровских овощных изолятов ВОМ и сравнительный филогенетический анализ с изолятами вируса, депонированными в GenBank, показали, что они входят в subgroup IA группы I.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенного исследования можно сделать следующие выводы.

1. Идентифицированы два хабаровских изолята вируса желтой мозаики фасоли, выявленные из овощных бобовых культур – фасоли обыкновенной и бобов конских, и два изолята вируса огуречной мозаики – тыквенных овощных растений из дыни и огурца.

2. Изучены для изолятов этих вирусов круг поражаемых растений, морфология вирионов и вирусные включения, физические свойства вирионов и способы передачи насекомыми и семенами, антигенные взаимоотношения с родственными видами, нуклеотидные последовательности (для ВОМ) и другие критерии,

позволившие идентифицировать новые изоляты вирусов, поражающие не только пасленовые, как это было показано нами ранее, но и бобовые и тыквенные овощные культуры в Хабаровском крае.

3. Показана возможность использования *2b* гена ВОМ в качестве маркера для ПЦР-диагностики.

4. Результаты исследования нуклеотидных последовательностей хабаровских изолятов ВОМ подтвердили данные по биологическим и антигенным свойствам при отнесении их к обычному штамму ВОМ группы I.

5. Изучение разнообразия нуклеотидных последовательностей хабаровских овощных изолятов ВОМ и

сравнительный филогенетический анализ с изолятами вируса, депонированными в GenBank, показали, что они входят в субгруппу IA изолятов вируса группы I.

Работа выполнена при финансовой поддержке в рамках грантов Президиума ДВО РАН (2003–2008, 2010 гг.).

## ЛИТЕРАТУРА

- Гнутова Р.В.** Серология и иммунохимия вирусов растений. М., 1993. 306 с.
- Гнутова Р.В.** Таксономия вирусов растений Дальнего Востока. Владивосток, 2009. 467 с.
- Гнутова Р.В.** Вирусы растений азиатской территории России: номенклатура и систематика // Изв. РАН. Сер. биол. 2011. № 1. С. 33–44.
- Гнутова Р.В., Золотарева Е.В.** Болезни овощных культур и картофеля на Дальнем Востоке России. Владивосток, 2011. 169 с.
- 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, выявленный на овощных культурах в Хабаровском крае // Сиб. вестн. с.-х. наук. 2008. № 10. С. 29–37.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В.** Вредоносность вируса огуречной мозаики для овощных и декоративных культур // Защита и карантин растений. 2011а. № 7. С. 24–26.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В.** Некоторые свойства дальневосточных изолятов вируса желтой мозаики фасоли, выявленных на бобовых культурах // С.-х. биология. 2011б. № 1. С. 104–111.
- 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.
- Bekesiova I., Peter J., Mlynarova L.** Isolation of high quality DNA and RNA from leaves // Plant Mol. Biol. Report. 1999. V. 17. P. 269–277.
- Brunt A.A., Crabree K., Dallwitz M.J. et al.** Cucumber mosaic cucumovirus // Plant Viruses Description and Lists from the VIDE Database. 1997. P. 471–483.
- Gnutova R.V., Nesmelov I.B., Tolkach V.F., Vischnichenko V.K.** Phylogenetic analyses on *2b* gene of cucumber mosaic cucumovirus // VI<sup>th</sup> Intern. conf. “Bioresources and viruses”. Kyev, Sept. 14–17. 2010. P. 69–70.
- Lin HX, Rubio L., Smythe A., Jiminez I M., Falk B.W.** Genetic diversity and biological variation among California isolates of *Cucumber mosaic virus* // J. Gen. Virol. 2003. V. 84, No. 1. P. 249–258.
- Liu Y.Y., Yu S.L., Lan Y.F. et al.** Molecular variability of five *Cucumber mosaic virus* isolates from China // Acta Virologica. 2009. V. 53, No. 2. P. 89–97.
- Palukaitis P., Roossinck M.J., Dietzgen R.G., Francki R.I.** Cucumber mosaic virus // Adv. Virus Res. 1992. V. 41. P. 281–348.
- Roossinck M.J.** Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses // J. Virol. 2002. V. 76, No. 7. P. 3382–3387.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al.** MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28, No. 10. P. 2731–2739.