

## Некоторые свойства вируса, изолированного из подсолнечника

Н. А. Князева\*, А. О. Закусило, Л. Ф. Диденко, А. Л. Бойко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко  
252017, Киев, ул. Владимирская, 64

*Изучены биологические и некоторые физико-химические свойства патогена, вызывающего желтую мозаику, гофрировку и деградацию листовой пластинки *Helianthus annuus* L. Установленные свойства изучаемого вируса позволили отнести его к роду *Tospovirus* семейства *Virusviridae* и идентифицировать как вирус, подобный вирусу бронзовости томатов.*

**Введение.** Вирусные болезни подсолнечника — важнейшей сельскохозяйственной культуры — исследованы недостаточно.

Ранние работы [1—6] носят гипотетический характер и посвящены описанию вирусоподобной симптоматики на растениях подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). В более поздних сообщениях дана характеристика некоторых биологических и физико-химических свойств возбудителей, вызывающих кольцевую мозаику, желтую пятнистость и некрозы [7—11].

В странах бывшего Советского Союза подобные исследования проводятся только на кафедре вирусологии Киевского университета имени Тараса Шевченко. Показана возможность естественного заражения в агроценозах подсолнечника вирусом табачной мозаики и S-вирусом картофеля, выявлены пути передачи вирусной инфекции [12—16].

Целью настоящего исследования являлась идентификация изолированного нами сферического вируса, поражающего подсолнечник, а также изучение его биологических и некоторых физико-химических свойств.

**Материалы и методы.** Патоген определяли с использованием электронной микроскопии [17], двойной иммунодиффузии в агаре [18] и иммуноферментного анализа — Das-ELISA [19, 20]. Оптическую плотность продукта пероксидазного окисления субстрата измеряли на вертикальном абсорбциометре («Dunpatech», Швейцария) или на приборе ИФКО-2 при длине волны 492 нм. Чувствительность метода ИФА считали достаточной при такой концентрации вируса (или разведении анализируемого экстракта растений), когда регистрируемая плотность продукта ферментативной реакции в два раза превышала ее значение в контрольной пробе [21]. Молекулярную массу капсидных белков определяли с помощью электрофореза вирусных белков в 10 %-м полиакриламидном геле в присутствии 0,1 %-го DS-Na [22], а также иммуноблотинга [23].

**Результаты и обсуждение.** Из листьев *H. annuus* L. и *H. tuberosum* L. с симптомами желтой крапчатой мозаики, морщинистости и деградации

\*Correspondence address.

верхушки листа, собранных на коллекционном участке диких видов подсолнечника (Краснодар, Россия), агроценозах Крыма и Украины, выделены изоляты (рис. 2—4, на рис. 1 — здоровое растение подсолнечника).

Электронно-микроскопические исследования сока листьев пораженных растений подсолнечника показали наличие гетерогенной популяции сферических вирусных частиц диаметром 50—120 нм, которые не удалось разделить с помощью растений-индикаторов (рис. 5).

Согласно литературным данным, из всех известных фитовирусов подобный полиморфизм присущ лишь вирусу бронзовости томатов (ВБТ).

Первоначально для очистки вируса применяли методы, предложенные для ВБТ [24, 25]. Однако из-за низкой концентрации в растительных тканях, склонности к агрегации и нестабильности патогена не удалось изолировать инфекционный вирусный материал, в связи с чем выделение патогена осуществляли по модифицированной нами методике [26]. Предло-



Рис. 1. Здоровое растение подсолнечника сорта Салют

Рис. 2. Мозаичная пятнистость растений подсолнечника сорта Салют

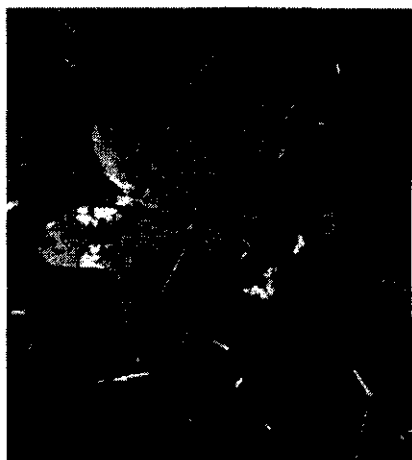


Рис. 3. Желтая крапчатость и некрозы листьев подсолнечника сорта Березанский

Рис. 4. Морщинистость и деградация верхушки листа подсолнечника гибрида Почин

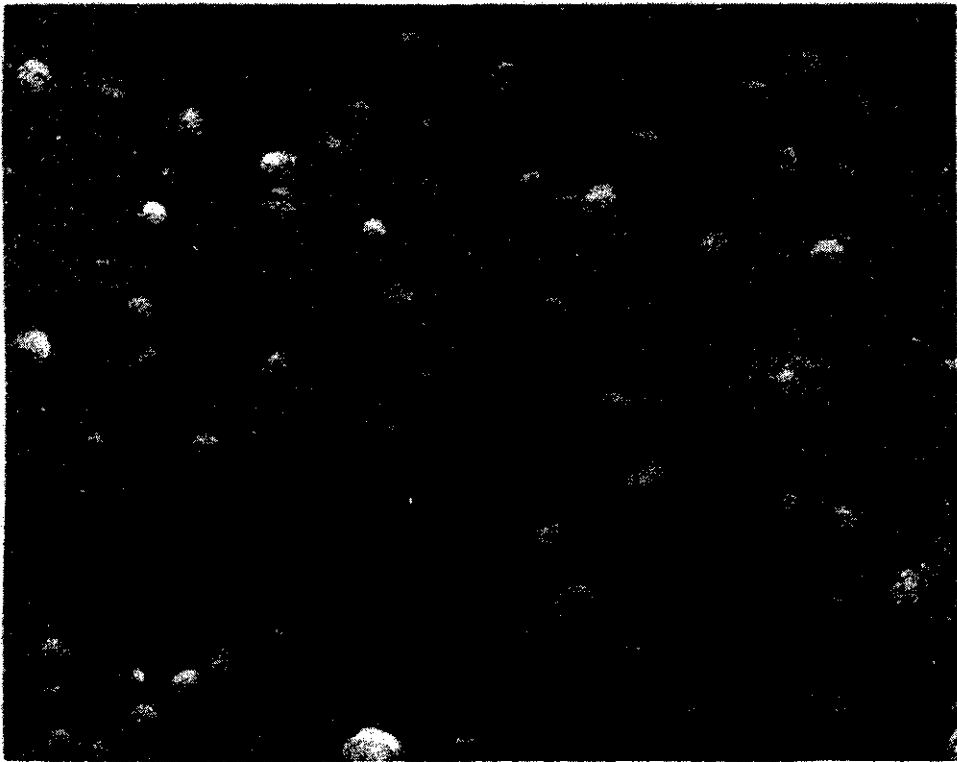


Рис. 5. Электроннограмма очищенного препарата полиморфного специфического вируса, изолированного из листьев подсолнечника. Напыление углеродом ( $\times 75\ 000$ )

женная схема очистки вируса обеспечила получение нативных вирусных частиц в препаративном количестве (29 мг на 1 кг свежих листьев).

Изучены биологические свойства выделенного изолята. Для определения круга растений, чувствительных к исследуемому патогену, использовали 34 вида растений из 16 семейств.

Выявлены 11 новых видов, кроме уже известных для ВБТ, среди которых *Urtica urens* L., *Tetragonia expansa* Murr., *Cucurbita pepo* L., *Malva rotundifolia* auct., *Phaseolus multiflorus* Wild., *Vicia sativa* L., *Salvia sclarea* L., *Nicotiana clevelandii* A., *Brassica sylvestris* L., *Gomphrena globosa* L., *Cineraria maritima* L. и два новых семейства: *Urticaceae* и *Amaranthaceae*. Из исследованных 34 видов растений вирусоспецифические симптомы наблюдали у 23.

В зависимости от степени чувствительности к патогену появление вирусоспецифических симптомов наблюдали на 5-й (*Nicotiana Debney* L., *N. rustica* L.), 7-й (*Petunia hybrida* L.), 8-й (*Chenopodium album* L., *Ch. amaranticolor* Coste et Rey.) и 9-й (*Urtica urens* L.) дни после инокуляции.

Наиболее пораженными изучаемым вирусом оказались растения семейств *Solanaceae* и *Fabaceae*, которые реагировали на инфицирование не только образованием некрозов, но и развитием системной реакции.

Выявлены растения-накопители — *Phaseolus vulgaris* L., *Vigna sinensis* L., *Nicotiana tabacum* сорта Самсун, *Chenopodium amaranticolor* L., *Ch. album* L.

Показано, что лучше всего вирус накапливается в листьях *Ph. vulgaris* L. и *N. tabacum* сорта Самсун, при этом валовый выход его составлял соответственно 29 и 22 мг на 1 кг инфицированных листьев.

Определены некоторые физико-химические свойства изучаемого пато-

гена. Предельное разведение инфекционного сока пораженных растений не превышало  $10^{-2}$ . Точка температурной инактивации изометрического вируса составляла  $43^{\circ}\text{C}$ .

При изучении условий хранения исследуемого изолята установлено, что в отсутствие сульфита натрия (стабилизатора вирусных частиц) при комнатной температуре вирус деградировал через 5—6 ч; при  $4^{\circ}\text{C}$  — через 25 сут; в 50 %-м глицерине — через 3—5 сут. Однако вирус, помещенный в жидкий азот, сохранял инфекционные и антигенные свойства в течение 6 месяцев.

Выявлено, что исследуемый возбудитель нестойк к органическим растворителям — бутанолу и хлороформу, обработка которыми снижает его инфекционность до 5 %. Это может свидетельствовать о наличии липидов в составе вирионов.

В преформированном градиенте плотности хлористого цезия определена плавающая плотность изометрического вируса, составляющая  $1,22\text{ г/см}^3$ , что также характерно для липидсодержащих вирусов (рис. 6).

Рассчитан коэффициент седиментации вируса, величина которого в градиенте плотности хлористого цезия равнялась 530 S.

Методом электрофореза в 10 %-м полиакриламидном геле в вирусосодержащих препаратах, деградированных DS-Na, а также с помощью иммуноблоттинга в составе вирионов выявлено наличие четырех мажорных структурных полипептидов с молекулярными массами  $78\pm 0,2$ ;  $58\pm 0,2$ ;  $52\pm 0,2$ ;  $27\pm 0,8$  кДа.

В табл. 1 представлены данные о белковом составе исследуемого сферического вируса в сравнении с изолятами ВБТ, полученными другими авторами.

К целым вирусным частицам получена антисыворотка, которая в реакции двойной иммунодиффузии в агаре имела титр 1:32—1:64, — свидетельство того, что патоген является слабым иммуногеном.

Как следует из приведенных в табл. 2 данных, подобные низкие значения характерны для антисыворотки к ВБТ.

При сравнении антигенных свойств исследуемого нами вируса с Крымским изолятом суровой бронзовости томатов (ВБТк), род *Tospovirus*, семейство *Bunyaviridae* (в реакции двойной иммунодиффузии в агаре, а также Das-ELISA/антисыворотка к изоляту из подсолнечника), установлено, что изолированный нами вирус серологически родствен, но не идентичен ВБТк. Степень же их серологического родства была слабой — 0,41.

При этом нам не удалось выявить родства с вирусом Баттаи (группа *Bunyamver*, семейство *Bunyaviridae*).

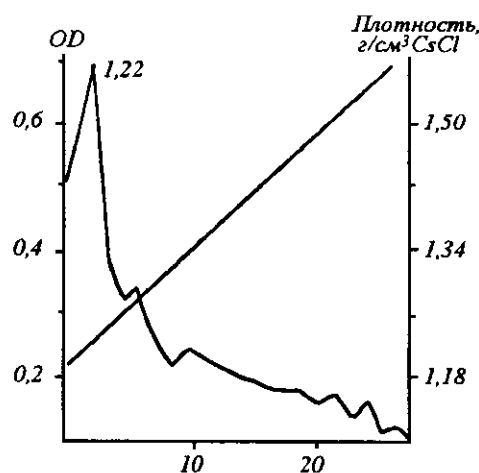


Рис. 6. Плавающая плотность вируса, изолированного из подсолнечника, в преформированном градиенте плотности хлористого цезия. По оси абсцисс — № фракции

Таблица 1  
Белковый состав некоторых изолятов ВБТ

Растения-накопители	Молекулярная масса, кДа	Литературный источник
<i>Nicotiana tabacum</i> L. сорта Самсун	84, 50, 29	[26]
<i>N. rustica</i> L.	78, 58, 52, 27	[27]
<i>N. rustica</i> L.	78, 58, 52, 27	[28]
<i>Impatiens</i> sp.	78, 52, 26	[29]
<i>Arachis hypogaea</i> L.	78, 58, 54, 27	[30]
<i>Arachis hypogaea</i> L.	78, 58, 29	[31]
<i>Allium cepa</i> L.	78, 52, 29	[32]
<i>Helianthus annuus</i> L.	79, 58, 52, 27	[33]

Таблица 2  
Определение титров антисывороток к ВБТ в реакции двойной иммунодиффузии в агаре

Антиген	Титр антисыворотки	Положительная реакция здоровых растений	Литературный источник
ВБТ	1:10	1:6	[34]
	1:8	—	[35]
	1:32—1:128	—	[36]
	1:32—1:128	—	[27]
Сферический вирус, выделенный из подсолнечника	1:32—1:64	—	[20]

Установленные свойства изучаемого полиморфного сферического вируса позволяют отнести его к роду *Tospovirus* семейства *Bunyaviridae* и идентифицировать как вирус, подобный вирусу бронзовости томатов.

Н. А. Князева, А. О. Закусило, Л. Ф. Діденко, А. Л. Бойко

Деякі властивості вірусу, ізольованого з соняшнику

Резюме

Вивчено біологічні та деякі фізико-хімічні властивості патогена, що викликає жовту мозаїку, гофрировку та деградацію листкової пластинки *Helianthus annuus* L. Встановлені властивості досліджуваного вірусу дозволили віднести його до роду *Tospovirus* родини *Bunyaviridae* та ідентифікувати як вірус, подібний до вірусу бронзовості томатів (ВБТс).

N. A. Knyazeva, A. O. Zakusilo, L. F. Didenko, A. L. Boyko

Some properties of the virus isolated from sunflower

Summary

Biological and some physical and chemical properties of a pathogen that causes yellow mosaic, leafcurl and degradation of the leafsheet of *Helianthus annuus* L. were studied. The properties of the virus studied allow to refer it to the *Tospovirus* genus of the *Bunyaviridae* family, therefore this virus can be classified as the tomato spotted wilt-lice virus (TSWVh).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Soriano S. Nota sobre algunas infermedales de los vegetales producidas por virus en la Republica Argentina // Physis.—1932.—11.—P. 87—92.
2. Целле М. А. Болезни подсолнечника.—Л., 1932.—30 с.
3. Рыжков В. А. Фитопатогенные вирусы.—М.: Изд-во АН СССР, 1946.—С. 154—155.
4. Muntanolla M. Discription de una nueva enfermedad del Girasol // Rev. Invest. agric. Buenos Aires.—1948.—2.—P. 205—212.
5. Sutic M. Occurrence of a new sunflower disorder in Yugoslavia // F. A. O. Plant Protection Bull.—1960.—8, N 11.—P. 129—132.
6. Sighn I. P. Mechanical and seed transmission of the causal agent of sunflower rugose mosaic in Kenya // The Sunflower Newsletter.—1979.—3, N 1.—P. 13—14.
7. Arnott H. T., Smith K. M. Electron microscopy of virusinfected sunflower leaves // J. Ultrastruct. Res.—1967.—19.—P. 173—195.
8. Munoz I., Giorda L., Teyssandier E., Lenardon S. Una virosis del girasol (*Helianthus annuus* L.) en la Republica Argentina // Resumens 4 Jorna das Fitosanitarias Argentinas Cordoba (19—21 de agosto, 1981).—Cordoba, 1981.—P. 31—32.
9. Kiehr-Delhey M., Delhey R. Necochence mosaic of sunflower in the southeast of the province of Buenos Aires, Argentina // Actas 3 Int. Sunflower Conf.—Buenos Aires, 1985.—P. 449—454.
10. Fernandez S. R. Breve resena bibliografica de algunas enfermedades y plagas que afectan al girasol // Rep. de investigacion del Inst. de vestigaciones fundamentales en agricultura tropical ISSN.—1988.—3.—P. 19—23.
11. Chod I., Skaloud V., Jokez M. Nalez V viru v souveslostic priznaky slunecnice // Ochr. rozte.—1990.—26, N 1.—P. 11—16.
12. Бойко А. Л., Литвинов Г. С., Сенчугова Н. А. О болезнях подсолнечника, вызываемых вирусами // С.-х. биология.—1985.—8.—С. 72—74.
13. Литвинов Г. С., Князева Н. А., Кондратюк Е. А. и др. Вирусологические аспекты ускоренной биотехнологии получения высокопродуктивных сортов и гибридов подсолнечника // Тр. 5-й Всесоюз. межвузовской конф. «Биология клетки».—Тбилиси, 1987.—Т. 2.—С. 669—670.
14. Litvinov G. S., Knyazeva N. A., Kondratyuk E. A. et al. The sunflower viral diseases diagnostics // Sunflower Assotiation (Novi Sad, Yugoslavia, July, 25—29 1988).—Novi Sad, 1988.—Vol. 11.—P. 10—15.
15. Князева Н. А., Смирнова С. А., Литвинов Г. С. и др. Вироzy подсолнечника в агроценозах юга Украинской ССР // Сб. тр. «Проблемы общ. и молекуляр. биологии».—1989.—8.—С. 87—90.
16. Князева Н. А., Бойко А. Л., Закусило А. О. та ін. Фітосанітарний контроль промислових плантацій соняшнику на наявність вірусних інфекцій // Біополімери і клітка.—1995.—11, № 6.—С. 81—88.
17. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих.—М., 1975.—324 с.
18. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis // Progr. Allergy.—1948.—5.—P. 1—78.
19. Clark M. F., Adams A. N. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol.—1977.—34.—P. 475—483.
20. Князева Н. А., Кондратюк О. А., Шарова А. О. та ін. Оптимізація умов діагностування вірусів, що уражують соняшник // Матеріали міжнарод. конф. «Сучасні методи досліджень в агрономії».—Умань, 1993.—С. 126—127.
21. Bantari E. E. Detection of potato viruses X, S, V by enzyme-linked immunosorbent assay on microcellulose membranes // Plant Disease.—1985.—69, N 10.—P. 202—205.
22. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680.
23. Gowbin H., Staehelin J., Jorgon J. Electrophoretic transport of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose heets; procedure and applications // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1979.—76, N 9.—P. 4350—4354.
24. Best R. I. Tomato spotted wilt virus // Adv. Virus Res.—1968.—13.—P. 65—146.
25. Mohamed N. A., Randles I. W., Francki R. I. B. Protein composition of tomato spotted wilt virus // Virology.—1973.—56.—P. 12—21.
26. Закусило А. О., Діденко Л. Ф., Князева Н. А. та ін. Виділення та очистка вірусу, що уражує соняшник // Укр. біохім. журн.—1994.—66, N 5.—С. 87—92.
27. Tas P. W. L., Boerjan M. L., Peters D. Purification and serological analysis of tomato spotted wilt virus // J. Gen. Virol.—1977.—36.—P. 267—279.
28. Wang M., Gonsalves D. ELISA detection of various tomato spotted wild virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus // Plant Disease.—1990.—74, N 2.—P. 154—158.

29. Law M. D., Moyer I. W. A tomato spotted wild like virus with a serologically distinct N protein // J. Gen. Virol.—1990.—71, N 4.—P. 933—938.
30. Sreenivasulu P., Demski I. W., Reddi D. V. R. et al. Purification and some serological relationships of tomato spotted wild virus isolates occurring on peanut (*Arachis hypogaea*) in the USA // Plant Pathol.—1991.—40, N 4.—P. 503—507.
31. Kormelink R. Functional analysis of the nonstructural proteins of tomato spotted wilt virus // Abstr. 9th Int. Congr. of Virology (Glasgow, Scotland, 8—13 August).—Glasgow, 1993.—P. 97.
32. Hall I. M., Speck I., Geske S., Moyer I. W. A tospovirus with a serologically distinct nucleocapsid isolated from onion (*Allium cepa*) // Ibid.—P. 357.
33. Zakusilo A., Knyazeva N., Didenko L., Boyko A. Identification of the Ukrainian virus isolate from *Helianthus annuus* L. with yellow spot mosaic symptoms // Arch. Phytopathol. Plantz.—1994.—28.—P. 13—19.
34. Feldman I. M., Boninsegna T. A. Antiserum for tomato spotted wilt virus // Nature.—1968.—219.—P. 183—184.
35. Tsakiridis I. P., Gooding G. V. J. Tomato spotted wild virus in Greece // Phytopathol. mediter.—1972.—11, N 1.—P. 42—47.
36. Joubert I. I., Hahn I. S., von Wechmar M. B. et al. Purification and properties of tomato spotted wilt virus // Virology.—1974.—57.—P. 11—19.