

УДК 633.34: 578.856

Некоторые свойства вируса зеленой мозаики фримы азиатской

Волков Ю.Г., Какарека Н.Н., Сапоцкий М.В.
Биолого-почвенный институт ДВО РАН

Резюме

На растении фрима азиатская *Phryma asiatica* (Hara) Probat. впервые выявлен изометрический вирус со следующими характеристиками: диаметр вирионов 30-32 нм; молекулярная масса капсидного белка – $41,4 \pm 0,8$ kD; ТТИ – 80°C; ПСИ – более 7 дней; ПРС – 10^{-4} . В холодильнике (не выше 4°C) инфекционность сока фримы сохранялась не менее 20 дней. К вирусу получена антисыворотка с титром в ИФА – 1/12800. Показано антигенное родство с вирусом кольцевой пятнистости табака. Патоген согласно этим данным относится к роду Nepovirus.

Summary

On a plant *Phryma asiatica* (Hara) Probat. for the first time is revealed the isometric virus with the following characteristics: diameter virions – 30-32 nanometers; molecular weight of a capsid protein – $41,4 \pm 0,8$ kD; TIP – 80°C; LIV – more than 7 days; DEP – 10^{-4} . In a refrigerator (is not higher 4°C) the infectivity of the phryma sap proceeded not less than 20 days. Against a virus the antiserum is obtained about which titer has made 1/12800. The antigenic affinity with the tobacco ring spot virus is shown. According to these data the pathogen falls belongs to Nepoviruses.

Растения рода фрима (*Phryma* L.) семейства вербеновые (Verbenaceae) распространены в Восточной Азии и Северной Америке. В России род представлен одним видом лесных многолетников *Phryma asiatica* (Hara) Probat. comb. nov. - *Ph. leptostachya* L. var. *asiatica* Hara - *Ph. leptostachya* subsp. *asiatica* (Hara) Kitamura. [7]. Ранее на этом виде не было описано вирусных заболеваний.

Материалы и методы

В окрестностях с. Никитовка Спасского района Приморского края было обнаружено несколько небольших очагов фримы азиатской с признаками мозаичного заболевания [5]. Растения имели типичную для мозаики расцветку листьев при незначительной контрастности пятен (рис. 1). Пораженные растения были доставлены в лабораторию, высажены в вегетационные сосуды и содержались в вегетационном домике с прикопкой на зиму в открытый грунт.



Рис. 1. Мозаика на растениях фримы азиатской.

Методика выделения и очистки:

1. Листья инфицированной фримы гомогенизировали на холоду без добавления буфера и отжимали сок.

Для контроля гомогенизировали листья здоровых растений фримы азиатской и с гомогенатом параллельно были проделаны те же манипуляции, что и с гомогенатом инфицированной фримы.

2. К отжатому соку добавляли буфер Трис-НСl рН 7,5 до 0,1 М; NaCl до 0,15 М; с добавлением меркаптоэтанола до 0,05% и Тритон Х-100 до 0,5%. Смесь центрифугировали при 10 тыс. g. 20 мин.

3. Вирус из супернатанта осаждали 8% полиэтиленгликолем (ПЭГ 6000). Центрифугировали и осадок суспендировали в небольшом объеме этого же буфера с 8 % ПЭГ;

4. Затем вирус из суспензии очищали от балластных веществ центрифугированием в градиенте концентрации сахарозы 5 – 30% с обращенным градиентом концентрации ПЭГ 8 – 0 % при 10 тыс. g в течение 60 мин.

5. Вирус из светопреломляющей зоны (отсутствующей в контроле) после трехкратного разбавления осаждали высокоскоростным центрифугированием (40 тыс. об/мин – 120 мин) Осадок суспендировали в воде.

Контроль проводили методом электронной микроскопии и электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лемли [9].

Полученный препарат использовали для отработки схемы иммунизации кроликов и получения антисыворотки, а так же для выявления антигенного родства.

Тестирование антисыворотки проводили непрямым методом иммуноферментного анализа (ИФА) [1].

Для выявления родственных взаимоотношений с вирусами: некроза табака (ВНТ) огуречной мозаики (ВОМ), кольцевой пятнистости табака (ВКПТ), мозаики костра безостого (ВМК), мозаики редиса (ВМР), мозаики резухи (ВМА), мозаики цимбидиума (ВМЦ) и мозаики горошка однопарного (ВМГО) кроме непрямого метода ИФА использовали также реакцию двойной диффузии в геле (РДД) [2].

Определение молекулярной массы капсидного белка проводили по относительной электрофоретической подвижности в ПААГ [11].

Препараты для электронной микроскопии готовили методами погружения (из листьев) и разбавленных суспензий [6].

Физико-химические характеристики вирионов (точку термической инактивации – ТТИ, предельное разведение сока – ПРС, период сохранения инфекционности в соке – ПСИ) проводили по стандартным методам [3].

Результаты и обсуждение

При исследовании этиологии заболевания оказалось, что инфекция легко передается механически на здоровые растения фримы и мари *Chenopodium quinoa Will.* и *C. amaranticolor Coste et Reyn.* На мари на инокулированных листьях появлялись локальные желтые пятна. Листья быстро желтели и опадали (рис. 2).



Рис. 2. Некрозы на мари киноа

С целью выявления круга растений-хозяев инокулировали следующие виды растений: *Chenopodium ambrosioides*, *Ch. capitatum*, *Ch. glaucum*, *Ch. murale*, *Ch. urbicum*, *Spinacia oleracea*, *Beta vulgaris*, *Nicotiana tabacum* ('Samsun', 'Xanthi'), *N. rustica*, *N. debney*, *N. glutinosa*, *Lycopersicum esculentum* ('Новато', 'Коралл'), *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger*, *Nicandra physaloides*, *Petunia hybrida*, *Amaranthus retroflexus*, *A. tricolor*, *Gomphrena globosa*, *Abutilon theophrasti*, *Lavatera thuringiaca*, *Papaver orientale*, *P. rhoeas*, *Dianthus barbatus*, *D. chinensis*, *Rumex aquaticus*, *Fagopirum esculentum* ('Приморская -60'), *Rabdosia excisa* (syn. *Plectranthus excisus*), *Cucurbita pepo*, *Cucumis sativus* ('ДВ-6', 'Уссурийский-3', 'Каскад', 'Лотос'), *Raphanus sativus* var. *radicula*, *Brassica rapa* ('Остерзунд'), *B. oleraceae* ('Слава'), *B. sabauda*, *B. cauliflora* ('Снежинка'), *Vicia faba*, *Pisum sativum* ('Неистошимый'), *Vigna sinensis*, *Phaseolus vulgaris* ('Scotia'), *Lathyrus hirsutus*, *Callistephus chinensis*, *Lactuca sativa*. Ни на одном растении симптомов поражения не выявлено. Исключение составила свекла *Beta vulgaris*. На инокулированных листьях свеклы наблюдали некротические пятна, в дальнейшем некротизированная ткань чернела и выпадала.

В препаратах из больных растений фримы и некрозов на инокулированных листьях мари обнаружены частицы икосаэдрической формы. Диаметр частиц 30-32 нм (рис. 3).

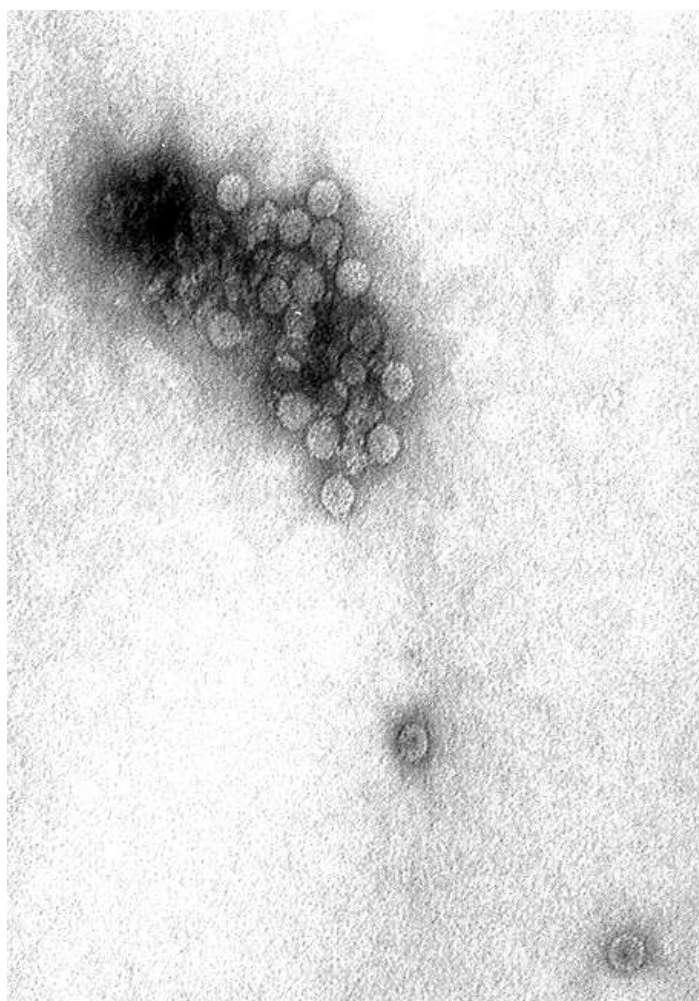


Рис. 3. Электроннограмма частиц вируса зеленой мозаики фримы азиатской.

Средняя молекулярная масса структурного белка вируса фримы азиатской (по результатам трех определений) - $41,4 \pm 0,8$ kD. (рис. 4).

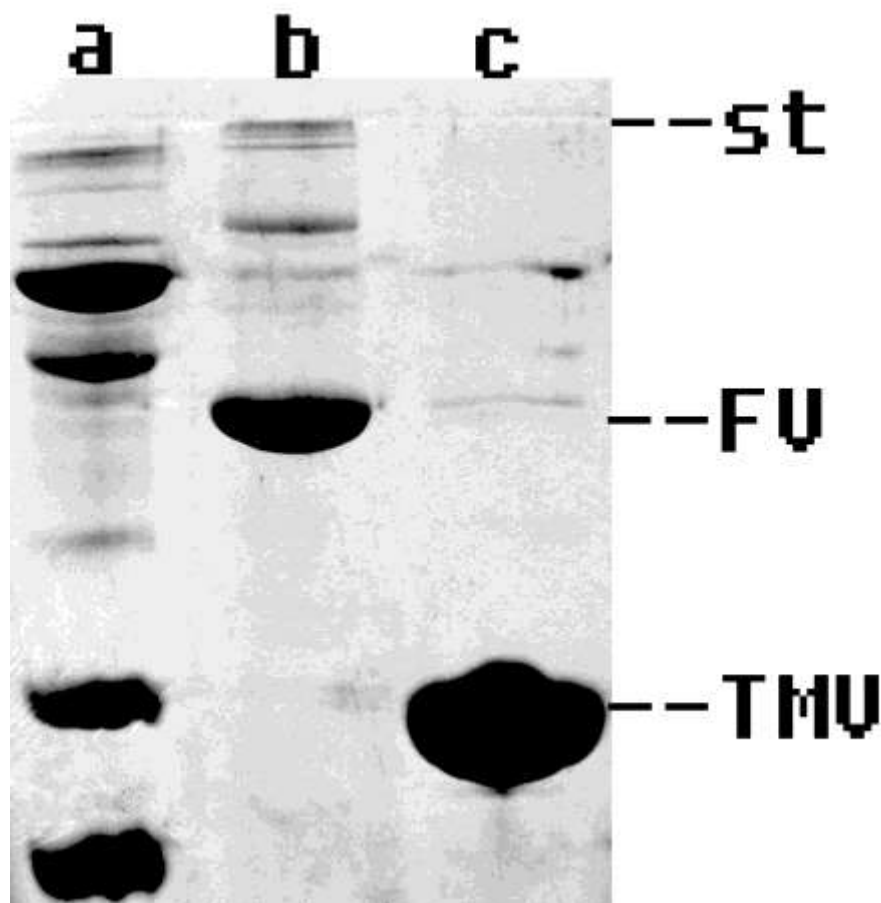


Рис. 4. Электрофореграмма частично очищенного препарата вируса фримы азиатской в 15% -ном полиакриламидном геле.

Обозначения:

st - линия старта

столбцы:

a - маркерные белки (снизу вверх - цитохром С (лошадиное сердце, 13 kD), миоглобин (лошадиное сердце, 18 kD), химотрипсиноген А (24 kD), овальбумин (45 kD), бычий сывороточный альбумин (67 kD) - все фирмы ICN;

b - белок вируса фримы (FV);

c - белок ВТМ (TMV);

Получены данные по физико-химическим характеристикам вирусного изолята из *Phryma asiatica*. Вирус достаточно стойкий и к температуре (ТТИ – 80°C), и к хранению (ПСИ – более 7 дней). В холодильнике (не выше 4°C) инфекционность сока фримы сохранялась не менее 20 дней. Предельное разведение сока – 10^{-4} .

Наилучшая схема иммунизации выглядит следующим образом:

1 иммунизация – 200 мкг вируса+полный адъювант Фрейнда в 9-12 точек внутрикожно;

2 иммунизация 150 мкг вируса+полный адъювант Фрейнда внутримышечно;

3 иммунизация 150 мкг вируса+полный адъювант Фрейнда внутримышечно;

Интервал между иммунизациями 7 дней.

4 иммунизация 250 мкг вируса внутривенно через 2 месяца после 3-ей иммунизации.

Взятие крови на 6, 8, 10 и 12 дни после последней иммунизации.

Титр антител определенный в непрямом варианте ИФА составил 1/12800.

В реакции двойной диффузии антиген из фримы образовал преципитат только с антисывороткой к вирусу из перца, ранее идентифицированному как вирус кольцевой пятнистости табака (ВКПТ) из рода *Nepovirus* [4].

Таким образом, вирус, вызывающий мозаику фримы азиатской относится к роду *Nepovirus* [8], но не заражает пасленовые как ВКПТ [10]. Видовая принадлежность и способ распространения патогена в природе не выявлены.

Литература

1. Буракова О.В. Иммуноферментный анализ// Практикум по иммунологии. – М.: Изд-во МГУ. – 2001. – С.69-82.
2. Воробьева Н.В. Иммунодиффузия в геле и иммуноэлектрофорез// Практикум по иммунологии. – М.: Изд-во МГУ. – 2001. – С. 42-63.
3. Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир. – 1978. – 429 с
4. Какарека Н.Н., Козловская З.Н., Волков Ю.Г., Плешакова Т.И. Идентификация и характеристика вируса поражающего перец овощной на юге Приморского края // Доклады Россельхозакадемии 2008. – № 4. – С. 16-18.
5. Костин В.Д. Вирозы дикорастущих растений Дальнего Востока России. – Владивосток: Дальнаука, 2005. – 121 с.
6. Развязкина Г.М., Вирусные болезни злаков. – 1975. – 290 с.
7. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. 1989. Т. 4. С. 365.
8. Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (eds.) (1996 onwards). Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.
9. Laemmly U.K.//Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature – 1970. – V.227. – N.5259.
10. Stace-Smith R. Tobacco ring spot virus// CMI/AAB Descript. Plant Viruses. – 1970. – No 17.
11. Weber K., Osborn M. The reability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis//J.Biol.Chem. – 1969. – vol. 224. – P.4406-4410.