

**ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСОВ НА ГЕОРГИНАХ**

Р.В. Гнутова¹, В.Ф. Толкач¹, О.М. Шелехова²

¹ Биолого-почвенный институт ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100-летия Владивостока, 159, e-mail: ibss@eastnet.febras.ru

² Ботанический сад-институт ДВО РАН,
690024, Владивосток, ул. Маковского, 142, e-mail: gardens@yandex.ru

Многолетними исследованиями показано, что в Дальневосточном регионе России *Cucumber mosaic virus* рода *Cucumovirus* семейства *Bromoviridae* на георгинах – самый распространенный вирус. Выявлен узкоспециализированный *Dahlia mosaic virus* рода *Caulimovirus* семейства *Caulimoviridae* и новый для рода *Dahlia* Cav. *Dahlia mild green mottle virus* рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*.

Ключевые слова: георгина, вирус, биологические свойства, идентификация, ПЦР-анализ.

**THE ESTIMATION OF RESULTS IDENTIFICATION
FAR EASTERN ISOLATIES VIRUSES ON DAHLIA SPECIES**

R.V. Gnutova¹, V.F. Tolkach¹, O.M. Shelekhova²

¹ Institute of Biology and Soil Science, FEB RAS, Vladivostok,
690022, 100-letia Vladivostok, Pr. 159, e-mail: ibss@eastnet.febras.ru

² Botanical Garden-Institute, FEB RAS, Vladivostok,
Makovskogo str., 142, Russia, e-mail: gardens@yandex.ru

In Far East region of Russia viruses *Cucumber mosaic virus* genus *Cucumovirus* family *Bromoviridae* and *Dahlia mosaic virus* genus *Caulimovirus* family *Caulimoviridae* are found, as it is shown by long-term research. *Cucumber mosaic virus* is most common virus on *Dahlia*. New *Dahlia mild green mottle virus* genus *Potyvirus* family *Potyviridae* is identified for genus *Dahlia* Cav.

Key words: *Dahlia* spp., virus, biological properties, identification, PCR-analysis.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в решении проблемы охраны растительного мира и тесно связанной с ней интродукцией растений важная роль принадлежит ботаническим садам. К сожалению, в настоящее время в России выявлением и изучением вирусов и болезней, ими вызываемых, в ботанических садах практически не занимаются. Хотя давно назрела необходимость на научной основе защищать интродуцируемые растения от вредителей и болезней. Особенно это важно для многолетних декоративных растений, например, георгинов. По богатству цветовой гаммы и редчайшей красоты соцветий георгины ставят на первое место среди цветущих растений. Кроме того, специально выведены низкорослые сорта для оформления рабаток, бордюров, озеленения балконов, что сейчас очень популярно. Сорта с высокими стеблями используются на срезку. Георгины (*Dahlia* Cav.) – многолетние растения из семейства *Asteraceae* Dum. Род объединяет 27 видов, распространенных в горных районах Центральной Америки. Культурные георгины пред-

ставлены сортами гибридного происхождения, объединенными в один вид – георгина культурная *Dahlia X cultorum* Thorsr. et Reis. В настоящее время насчитывается более 15 тыс. сортов.

Основными вредителями георгинов являются насекомые – трипсы, тля и паутинный клещ. Иногда наблюдается поражение корневым раком, вызывающим образование на клубнях георгинов наростов, которые со временем загнивают, и растение погибает. В ботанических садах, промышленном цветоводстве, частных фермерских хозяйствах и приусадебных участках многие растения открытого грунта, в том числе и георгины, поражаются вирусами, которые не только влияют на рост растения, но и снижают его товарный вид и привлекательность. Из сотни существующих вирусов лишь только более десятка из них способны заразить георгины. Вирусы различаются по типу вектора, ответственного за распространение, типу наносимого им ущерба посевному материалу, по происхождению источников вируса и по процедуре контро-

ля. Ниже приводим список вирусов, поражающих георгины в мире (Brunt, 1971; Kameya-Iwaki, 1998; Pappu, Wyatt, 2008):

1. *Beet mosaic virus (BMV)*.
2. *Beet yellow virus (BYV)*.
3. *Chrysanthemum virus B (CBV)*.
4. *Cucumber mosaic virus (CMV)*.
5. *Red current ringspot virus (RCRV)*.
6. *Dahlia mosaic virus (DMV)*.
7. *Impatiens necrotic spot virus (INSpV)*.
8. *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*.
9. *Tobacco streak virus (TSV)*.
10. *Tobacco ringspot virus (TRV)*.
11. *Tobacco mosaic virus (TMV)*.
12. *Potato X virus (PVX)*.
13. *Tobacco necrosis virus (TNV)*.
14. *Tomato ringspot virus (ToRV)*.

Наиболее часто георгины поражаются узкоспециализированным *Dahlia mosaic virus* (Fauquet, Mayo, 2001), а также неспецифическими вирусами, имеющими большой круг естественных и экспериментальных растений-хозяев, такими как *Tobacco streak virus* (Brunt et al., 1997), *Tomato spotted wilt virus* (Fauquet, Mayo, 2001), *Potato X virus* (Bercks, 1970), *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco necrosis virus* и *Tomato ringspot virus* (Navalinskiene, Samuitiene, 2006). На листьях георгинов обычно вирусы вызывают хлоротичную кольцевую пятнистость, яркую крапчатость, дубовидный узор, деформацию листьев и стеблей, асимметрию цветов и задержку роста растений. Георгины, пораженные вирусом, сохраняют его в клубнях в зимний период при хранении и поэтому являются источником вирусной инфекции не только для здоровых растений георгинов, но и других декоративных и овощных культур. Остановимся на краткой характеристике наиболее распространенных вирусов для этой культуры.

Tomato spotted wilt virus из рода *Tospovirus* семейства *Bunyaviridae* вызывает у георгинов симптомы в виде хлоротичной кольцевой пятнистости на листьях и дубовидного листового узора (Fauquet, Mayo, 2001). Хотя георгины являются одним из основных хозяев этого вируса, он может заражать многочисленные виды растений из семейств: *Asteraceae* Dum., *Bromeliaceae* Juss., *Convolvulaceae* Juss., *Fabaceae* Lindl., *Solanaceae* Juss., *Tropaeolaceae* DC. Переносчиком TSWV считаются несколько видов трипсов: *Thrips tabaci*, *T. setosus*, *T. parvi* и др. (Boonham et al., 2002). Вирус передается механической инокуляцией, прививкой, но не передается контактно, пылью и семенами. Экспериментально вирус заражает *Cucumis sativus* L., *Petunia hybrida* Vilm., *Nicotiana clevelandii* L., *N. glutinosa* L., *N. tabacum* L., *N. rustica* L., *Catharanthus roseus* G. Don, *Gomphrena globosa* L. и *Tropaeolum majus* L. Вирионы изометрические, 85 нм в диаметре. Во всех частях зараженного растения выявлены вирусные вклю-

чения. Вирус довольно нестабильный, имеет точку термической инактивации (ТТИ) – 45 °С, сохраняется при комнатных условиях (ПСИ) не более 5 ч, предельное разведение вируса в соке (ПРС) – 10^{-3} , при котором он может заражать чувствительные тест-растения. Георгина – основной резервуар вируса, поэтому необходима пространственная изоляция посадок георгинов, например от посадок томатов, которые этот вирус поражает довольно часто.

Tobacco streak virus из рода *Ilarvirus* семейства *Bromoviridae* на георгине проявляется в виде яркой крапчатости на листьях или бессимптомно (Brunt et al., 1997). Естественными хозяевами вируса являются *Phaseolus vulgaris* L., *Glycine max* L., *Rosa* L., *N. tabacum*, *Melilotus albus* Desr., *Trifolium pratense* L., *Asparagus officinalis* L. Векторную передачу вируса осуществляют трипсы. Кроме того, вирус может передаваться прививкой, механической инокуляцией, семенами и пылью, но контактно между растениями передачи вируса не происходит. При механическом заражении вирусом чувствительными растениями являются *Suamopsis tetragonolobus* (L.) Taub., *Ph. vulgaris*, *Vigna unguiculata* Walpers, *Datura stramonium* L., *C. roseum*, *C. sativus*, *N. tabacum* и *G. globosa*. Вирионы квазиизометрические – 30 нм в диаметре, иногда бациллоподобные, ТТИ – 64 °С, ПРС – 10^{-4} , ПСИ – 1 сут.

Potato X virus из рода *Potexvirus* семейства *Flexiviridae* имеет естественные растения-хозяева среди овощных и декоративных культур. Распространяется вирус контактно и механической инокуляцией, не отмечена передача вируса семенами, пылью. Кроме того, до сих пор не выявлено насекомое-переносчик вируса. Экспериментальный круг растений-хозяев ограничен видами из трех семейств: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae* и *Solanaceae* (*G. globosa*, *Chenopodium quinoa* Willd. и *Ch. amaranticolor* Coste et Reyn, *D. stramonium* и *N. tabacum*). Морфология вирионов представляет собой слегка извилистые палочки, длина которых 515 нм, а ширина 13 нм. У инфицированных вирусом растений выявлены вирусные включения в виде аморфных Х-тел (Bercks, 1970). ТТИ – 68–76 °С, ПРС – 10^{-5} – 10^{-6} , ПСИ – 40–60 сут.

Cucumber mosaic virus из рода *Cucumovirus* семейства *Bromoviridae* – полифаг, поражает множество дикорастущих растений, а также овощные, плодовые, ягодные, бобовые и декоративные культуры (Гнутова, Толкач, 2002; Толкач, Гнутова, 2007; Гнутова, 2009). Основными естественными растениями-хозяевами вируса считаются *C. sativus*, *Lycopersicon esculentum* Mill., *Spinacia oleracea* L. У георгинов вирус вызывает симптомы на листьях в виде светло- и темно-зеленой мозаики, измельчения и деформации листьев, стеблей, асимметрии цветов, карликовости растений. В естественных условиях CMV передается более чем 60 видами тлей. Вирионы изометрические, 29 нм в диаметре. Диагностическими растениями-индикаторами являются *V. unguiculata*, *C. sativus*, *L. esculentum*,

Ch. quinoa и *Ch. amaranticolor*, *N. glutinosa*, *N. tabacum*, *N. clevelandii*. ТТИ – 55–70 °С, ПРС – 10^{-3} – 10^{-6} , ПСИ – 1–10 сут.

Dahlia mosaic virus относится к роду *Caulimovirus* семейства *Caulimoviridae*. Впервые вирус описан в 1928 г. (Brandenburg, 1928, цит. по: Brunt, 1971). Вирусные частицы изометрической формы, 50 нм в диаметре. Естественным хозяином вируса является *Dahlia pinnata* Cav., однако по литературным данным вирус может инфицировать растения семейств: *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Solanaceae* (Brunt, 1971). При естественном заражении вирусом *Dahlia* spp. симптоматика во многом зависит от сорта растения. При инфицировании DMV одних сортов георгинов он вызывал хлоротичное посветление жилок листьев и их искривление; у других, наиболее чувствительных к заражению, – приостановку роста; у третьих, менее восприимчивых, – латентную инфекцию. У большинства сортов, пораженных вирусом, ткань листьев, окаймляющая среднюю и боковые жилки, имела зеленовато-желтую окраску. В зависимости от сорта георгины форма и ширина окаймлений бывает различной. У одних сортов листья имели почти желтую окраску, у других – естественная окраска сохранялась, однако они становились деформированными, морщинистыми, с пузырчатymi вздутиями. Отмечены также растения, имеющие карликово-кустистый вид с множеством боковых побегов,

укороченными междоузлиями, с мелкими мозаичными листьями. Цветоносы сильно укорочены, иногда наблюдалась деформация цветков. Растениями – индикаторами вируса – являются: *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. & Hook. F. ex A. Gray, *Dahlia pinnata*, *Zinnia elegans* Jacq., *Amaranthus caudatus* L., *Ageratum* L., *Chenopodium capitatum* (L.) Aschers. В природе передача вируса осуществляется непersistентным способом 16 видами тлей (*Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *Macrosiphum euphorbiae* и др.), прививкой, соком – с трудом. Сохраняется вирус в клубнях больных растений и распространяется при вегетативном размножении. Перенос вируса семенами и повиликой не зарегистрирован. Свойства вирусных частиц в соке: ТТИ – 75–80 °С, ПРС – 10^{-4} , ПСИ – от 16 дней до 1 мес. (Макутенайте-Навалинскене, 1981; Билай и др., 1988; Kameya-Iwaki, 1998).

На юге Дальнего Востока (ДВ) России *Dahlia* spp. цветут с июля до конца октября, т. е. весьма продолжительный и теплый период времени, хотя в диком виде растут в условиях короткого дня и прохладных ночей. С 2000 г. нами проводились ежегодные обследования посадок георгинов как в частных хозяйствах Приморского и Хабаровского краях, так и в Ботаническом саде-институте (БСИ) ДВО РАН г. Владивостока с целью выявления и идентификации вирусов. Полученные данные сравнивались с литературными для достоверной детекции изучаемого вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе коллекции георгинов БСИ ДВО РАН. Материалом служили различные сорта георгинов, пораженные вирусной инфекцией. Для идентификации вирусов биологическим тестированием применяли модификацию экспериментального подбора тест-растений в тепличных условиях, используемую нами более 10 лет (Толкач, 1995). Для изучения роли насекомых в передаче вирусной инфекции использовали *Myzus persicae* Sulz. Для электронно-микроскопического исследования вирусных частиц в соке применяли метод негативного контрастирования 2%-м водным раствором уранилацетата

(Развязкина и др., 1968). Вирусные включения изучали под световым микроскопом. По ранее разработанным методикам определяли антигенные свойства капсидных белков и антигенное родство среди изучаемых вирусов (Гнutowa, 1985). Для постановки реакции иммунодиффузии (РДД) использовали 1%-й бакто-агар (Serva, ФРГ) в 0.15 М растворе хлористого натрия с добавлением 1.5 % ПЭГ (м.м. 6000) для более четкого проявления линий преципитации. Детекцию дальневосточных изолятов DMV и CMV проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Богун, 2006; Nesmelov et al., 2009).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В 2000 г. впервые в Дальневосточном регионе на георгине был обнаружен *Dahlia mosaic virus* с симптомами яркого хлороза и слабой деформации листовой пластинки (Tolkach, Gnutova, 2002). Ранее вирус был найден в бывшем СССР только в Литве (Макутенайте-Навалинскене, 1981). Дальневосточный изолят DMV имеет изометрические частицы диаметром около 50 нм. Для изучения круга растений-хозяев и симптоматики выявленного патогена инокулировали вирусом 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* Murr.) и *Chenopodiaceae* (*Ch. amaranticolor* и *Ch. murale*), *Asteraceae* (*D. pinnata*, *Zinnia elegans*, *Verbesina encelioides*) и *Solanaceae* (*N. tabacum* cvs. Xanthi, Samsun, *N. rustica*, *Petunia hybrida*). Определены физические свойства дальневосточного изолята DMV: ТТИ – 65–70 °С, ПРС – 10^{-4} , ПСИ – 6 сут. Исследуемый изолят оказался менее стабилен по сравнению с описанными в литературе: ТТИ – 75–80 °С, ПРС – 10^{-3} , ПСИ – 2 сут. (Brunt, 1971) и ТТИ – 85 °С, ПРС – 10^{-3} (Макутенайте-Навалинскене, 1981). Вирус легко передавался *M. persicae*. Георги-

Таблица 1

Коллекционные сорта георгинов, выявленные с симптомами поражения CMV в БСИ ДВО РАН

| Сорт | Симптомы поражения листьев |
|------------------|--|
| Анхем | Яркая хлоротичная пятнистость |
| Анюта | Яркий хлороз жилок, хлоротичная кольцевая мозаика |
| Апачи | Хлоротичная пятнистость |
| Апаш | Хлоротичная кольцевая мозаика |
| Астероид | Хлоротичная пятнистость, искривление листьев |
| Бамбино | Мозаичное окаймление жилок |
| Bony blue | Яркий хлороз жилок, морщинистость |
| Боярыня | Хлороз средних и мелких жилок, хлоротичная крапчатость между жилками |
| Breinshtein | На молодых листьях слабый хлороз жилок |
| Burgundii | Мозаичное окаймление жилок |
| Gelery Pablo | Яркий хлороз жилок и темно-зеленые вздутия листовой пластинки |
| Gold Carbe | Хлоротичная кольцевая мозаика вдоль главной жилки |
| Дамский каприз | Хлоротичная крапчатость, пятнистость |
| Diana | Мозаика, деформация |
| Дуэт | Яркое окаймление главной и средних жилок |
| Дыхание Арктики | Измельчение листьев, хлоротичная мозаика |
| Золотое руно | Светло-зеленая пятнистость |
| Инара | Хлороз всех жилок |
| Индира Ганди | Деформация, мозаичность листьев |
| Колхозница | Яркое окаймление средних и мелких жилок |
| Лев Толстой | Светло-зеленая мозаика |
| Лунная династия | Темно-зеленые вздутия листовой пластинки |
| Маяковский | Хлороз ткани |
| Милые детки | Хлоротичное окаймление жилок, деформация |
| Oziris | Хлоротичная пятнистость на листьях всех ярусов |
| Пантера | Яркая хлоротичная кольцевая мозаика |
| Park Princess | Светло-зеленая мозаика |
| Петр I | Вдоль главной жилки хлоротичная пятнистость |
| Purpul Game | Яркий хлороз жилок |
| Riga | Мозаичное окаймление жилок |
| Rose Preference | Зеленое окаймление жилок |
| Rubin | Хлоротичная пятнистость, морщинистость |
| Сакура | Деформация, измельчение листьев |
| Смедович | Яркая хлоротичная кольцевая мозаика |
| Смутлянка | Хлороз ткани листа |
| Spensenmeer | Светло-зеленая пятнистость |
| Gloconda | |
| Triumph de Paris | Светло-зеленая крапчатость |
| Vaidala | Измельчение листьев, яркая хлоротичная крапчатость |
| Chimene Carnaval | Темно-зеленые вздутия листовой пластинки |
| Cha-cha | Яркая светло-зеленая кольцевая мозаика |
| Цыганский барон | Хлороз всех жилок, хлоротичная крапчатость между жилками |
| Черный лебедь | Вдоль главной жилки хлоротичная пятнистость |
| Evelin | Морщинистость, деформация |
| Юра | Едва заметная зеленая крапчатость |

на и все системно инфицируемые изучаемым вирусом растения содержали в цитоплазме сферические и эллипсоидные включения, очень сходные с теми, что индуцирует *Caulimoflower mosaic virus (CaMV)* из семейства *Caulimoviridae* (Богунов, Гнутова, 2002).

В РДД инфекционный сок (исходный образец) с антисывороткой с высоким титром специфических антител против *CMV*, полученной из приморского изолята *CMV*, выявленного из *C. sativus* (Чернявская, 2003), не реагировал, что свидетельствовало о моноинфекции. Кроме того, *DMV* в РДД показал антигенное родство с антисывороткой, полученной нами ранее против *CaMV*. Тем не менее, несмотря на близкие антигенные свойства капсидных белков и другие общие свойства, вирусы *DMV* и *CaMV* по кругу растений-хозяев не совпадали и инфицировали различные растения-хозяева. По биологическим, антигенным и физическим свойствам вирионов дальневосточный изолят *DMV* незначительно отличался от изолятов *DMV*, описанных в литературе (Kameya-Iwaki, 1998; Parpu, Wyatt, 2008) и не имел сходных свойств с вирусами, представленными нами во введении в перечне вирусов, поражающих георгины. Для дальнейшей детекции дальневосточного изолята *DMV* использовали ПЦР. О присутствии ДНК *DMV* в образцах (соках), инфицируемых вирусом, свидетельствовали треки при постановке электрофореза длиной ~1440 пар нуклеотидов при амплификации с праймерами 1D-F-1D-R. Для доказательства специфичности амплифицируемых фрагментов *DMV* был разработан вариант гнездовой ПЦР с праймерами 2D-R и 2D-F (5'-AAAGAACATCAACTTAGTAGCC-3') и (5'-GCTTGGGCCTAGTATATTTC-3'). Амплифицированный фрагмент (локализация 843–1165 последовательности AY291588) длиной 323 п.н. был секвенирован (регистрационный номер в GenBank AY971810) и сравнен с таковым из GenBank (Богунов, 2006). Гомология с последовательностью AY291588 составила 97,7 %, что свидетельствовало об амплификации ДНК *DMV*. Предложенный вариант детекции генома *DMV* был использован автором для скрининга вируса в естественно-зараженных растениях георгины. Образцы были взяты нами в результате ежегодного мониторинга, проводимого в различных регионах ДВ в 2004–2005 гг. Из 55 образцов георгинов в 12 присутствует ДНК *DMV*. Результаты скрининга свидетельствовали о распространении вируса на юге ДВ, особенно в Приморском крае. В образцах георгинов из Хабаровского края *DMV* не был обнаружен. Итак, на ДВ России идентифицирован узкоспециализированный для георгинов вирус мозаики, который весьма распространен там, где выращивают эту декоративную культуру.

Коллекция георгинов в БСИ ДВО РАН ежегодно пополняется, и в 2007 г. она состояла из 85 сортов. У 44 сортов георгинов были выявлены симптомы вирусного поражения, вызванные *CMV* (табл. 1). Методом РДД с антисывороткой против *CMV* был выявлен

этот вирус во всех 44 образцах растений. Исключение составил только образец георгина сорта Юра с симптомами едва заметной зеленой крапчатости на листьях. Полученные данные подтвердили наличие в коллекции довольно распространенного *CMV*. Об этом свидетельствуют и литературные источники (Гнутова, 2009; Navalinskiene, Samuitiene, 2006). В результате комплексного вирусологического исследования георгинов нам удалось показать широкое распространение *CMV* и в частных хозяйствах. Растения георгинов на инфицирование вирусом реагировали хлоротичным окаймлением жилок и яркой крапчатостью листьев, иногда наблюдали измельчение и деформацию цветков. Дальневосточный изолят *CMV* легко переносился тлей, механически и прививкой, перезимовывал в клубнях и не распространялся с помощью семян.

Для *CMV* характерно большое видовое разнообразие. Известно более 60 штаммов, которые классифицируются на две группы на основе обнаруженных различий в последовательности их генома, а также антигенных и биологических свойств (Lin et al., 2003). Популяция дальневосточного *CMV* довольно многочисленна, выявлено более 40 изолятов вируса на декоративных, овощных, бобовых культурах и на картофеле (Толкач, Гнутова, 2007; Гнутова, 2009). В 90-е годы прошлого столетия все приморские изоляты *CMV*, согласно данным, полученным методами количественной иммунохимии, были отнесены к дальневосточному серотипу со слабыми иммуногенными свойствами (Гнутова, 1993). Это указывало на то, что они отличаются по структуре эпитопов капсидных белков от других известных штаммов и изолятов *CMV*. Для более убедительного доказательства существования самостоятельной российской дальневосточной популяции вируса требовалось изучение структуры их генома. В 2008 г. в результате совместной работы с ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН была исследована группа новых приморских изолятов *CMV*, поражающих декоративные растения, – *Petunia hybrida* и орхидеи родов *Cattlea* spp. и *Cambria* spp. Оказалось, что они принадлежат, как свидетельствовали результаты ПЦР-анализа, по современной международной классификации, к подгруппе изолятов IV (восточно-азиатские изоляты *CMV*). Филогенетический анализ первичных последовательностей 2b гена изолятов *CMV*, например из *Cattlea* spp. и *Cambria* spp., показал, что эти приморские изоляты *CMV* объединяются в самостоятельную группу, достаточно отстоящую от зарубежных штаммов *CMV* (Nesmelov et al., 2009). Ранее нами природная популяция *CMV* на ДВ России по биологическим свойствам была отнесена к группе I *CMV*. Исследование видового разнообразия *CMV* имеет большую практическую значимость, так как вредоносность вируса для декоративных культур, в том числе и для георгинов, очень велика. У большинства декоративных растений отсутствует иммунитет к данному вирусу,

поэтому очень трудно выделить не только виды, но и сорта, устойчивые к *CMV*. Успешная защита культурных видов растений от этого вируса зависит от своевременного его выявления. Важнейшим мероприятием в борьбе с *CMV* является предварительное тщательное визуальное обследование растений. Так симптомы проявления *CMV* на растениях хорошо заметны. Больные растения необходимо сразу же уничтожать.

Итак, изученные нами вирусные инфекции, поражающие георгины, включали как узкоспециализированный вирус – *DMV*, так и широко распространенный – *CMV*. Идентификация третьего возбудителя заболевания георгина сорта Юра усложнялась, так как патоген имел морфологию частиц, физические свойства вирионов, вирусные включения в клетке больного растения, антигенное родство с дальневосточными изолятами потивирусов, характерные для видов рода *Potyvirus*. К сожалению, в литературе мы не встретили сообщения о том, что георгины могут заражаться вирусами из этого рода. По специфическим внешним симптомам проявления на георгинах мы назвали новую вирусную инфекцию *Dahlia mild green mottle virus (DMGMV)*.

Для достоверной идентификации вируса изучали его биологические и антигенные свойства. Исследуемым изолятом вируса инокулировали растения 68 видов и сортов из семейств: *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Tropaeolaceae*. Вирусом заразились растения 26 видов и сортов (табл. 2). Локальную реакцию *DMGMV* вызывал только у растений *Ch. quinoa* и *Ch. murale*, а *Ch. amaranticolor* оказалась невосприимчивой к заражению. По результатам исследований отмечено, что наиболее чувствительны тест-растения из семейства *Cucurbitaceae*. Практически все используемые сорта *C. sativus*: Маркетер, Турниф, ДВ-27, Водолей, Лотос, Восток, Хабар заражались изучаемым изолятом *DMGMV*. Устойчивыми к вирусу оказались только два сорта *C. sativus*: ДВ-6 и Каскад. *DMGMV* заражал экспериментально растения – *Cucurbita pepo* var. *patisson* Duch. сортов Белый, Солнышко и Зонтик; *Cucurbita maxima* сортов Ананская, Миндальная, а также *Cucurbita pepo* L. сортов Итальянский полосатый, Оранжевый, Желтоплодный, Грибовский, Золотинка (исключение составил сорт Цукеша). Из других растений заражались вирусом: *P. hybrida* сорт Снежный шар и *Physalis floridana* Rydb. сорт Кондитерский (семейство *Solanaceae*); *Trigonella foenum-graecum* L. и *Melilotus albus* L. (семейство *Fabaceae*); *Z. elegans* и *D. pinnata* (семейство *Asteraceae*), *Spinacea oleracea* L. (семейство *Chenopodiaceae*). Экспериментально заражаемые растения, у которых внешне не проявлялись симптомы вирусного поражения, проверяли на наличие латентной инфекции. Для этого спустя 1 мес. после инфицирования, верхними листьями этих растений заражали чувствительные

Таблица 2

Окончание табл. 2

| Реакция тест-растений на заражение DMGMV, выявленным из георгины сорта Юра | |
|---|----------------------|
| Тест-растения | Симптомы поражения |
| 1 | 2 |
| <i>Antirrhinum majus</i> | o |
| <i>Amaranthus caudatus</i> | o |
| <i>Calendula officinalis</i> | o |
| <i>Callistephus chinensis</i> | o |
| <i>Capsicum annuum</i> | |
| сорт Свежесть | o |
| Виктория | o |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> | o |
| <i>Chenopodium quinoa</i> | L:N |
| <i>Ch. murale</i> | L:N |
| <i>Chrysanthemum</i> spp. | o |
| <i>Celosia argentea</i> | o |
| <i>Citrullis vulgaris</i> сорт Огонек | o |
| <i>Cosmos</i> sp. сорт Морские ракушки | o |
| <i>Cucumis sativus</i> | |
| сорта Маркетер | S:ClVe, Mot |
| Водолей | S:Mot |
| ДВ-6 | o |
| Турниф | S: GrM, Dis |
| ДВ-27 | S: ClVe, GrBdVe |
| Каскад | o |
| Лотос | S: GrMot |
| Восток | S: ClMot |
| Хабар | S: ClMot |
| <i>Cucurbita maxima</i> | |
| сорта Ананасная | S:GrBdVe |
| Миндальная | ClMot, S: ClMot |
| <i>C. pepo</i> var. <i>patisson</i> | |
| сорта Солнышко | S:GrBdVe, S: Cl, Dis |
| Зонтик | S: ClMot |
| Белый | S: ClMot |
| <i>C. pepo</i> | |
| сорта Итальянский полосатый | S: ClVe, GrMot |
| Оранжевый | o |
| Цукеша | S: GrBdVe |
| Желтоплодный | ClMot |
| Грибовский | S: ClVe, ClMot |
| Золотинка | S: Cl, Dis |
| <i>Dahlia pinnata</i> сорт Помпонная | S: ClMot |
| <i>Datura stramonium</i> | o |
| <i>Dianthus barbatus</i> sp. | o |
| <i>Faba bona</i> | o |
| <i>Gailardia</i> sp. | o |
| <i>Gomphrena globosa</i> | o |
| <i>Gypsophylla grandiflora</i> | o |
| <i>Hyoscyamus niger</i> | o |
| <i>Lactuca sativa</i> сорт Лолло Россо | o |
| <i>Petunia hybrida</i> | |
| сорта Снежный шар | S: ClVe, Nve |
| Fayer chif | o |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | |
| cvs. Top crop | o |
| Perlicka | o |

| 1 | 2 |
|--|-----------------|
| <i>Pisum sativum</i> | o |
| <i>Lycopersicon esculentum</i> | |
| сорта Волгоградский | o |
| Хабар-308 | o |
| Хабаровский | o |
| <i>Physalis floridana</i> | |
| сорт Кондитерский | S: GrMot, ClMot |
| <i>Melilotus albus</i> | S: Dis, ClVe |
| <i>Nicandra physaloides</i> | o |
| <i>Nicotiana alata</i> сорт Зеленый цвет | o |
| <i>N. debney</i> | o |
| <i>N. glutinosa</i> | o |
| <i>N. tabacum</i> | |
| cvs. Samsun | o |
| Xanthi | o |
| <i>Spinacia oleracea</i> | L:N |
| <i>Tagetes erecta</i> sp. | o |
| <i>Trigonella foenum-graecum</i> | S: ClVe |
| <i>Tropaeolum majus</i> | o |
| <i>Verbesina encelooides</i> | o |
| <i>Vigna sinensis</i> | o |
| <i>Vigna unquiculata</i> | o |
| <i>Zinnia elegans</i> | |
| сорт Новый аттракцион | S: ClVe |

Примечание. S – системное поражение; L – локальное поражение; ClVe – хлороз жилок; NVe – некроз жилок; N – некрозы; Dis – деформация; Mot – крапчатость; GrMot – зеленая крапчатость; ClMot – хлоротичная крапчатость; GrBdVe – зеленое окаймление жилок; o – не заражается; GrM – зеленая мозаика; Cl – хлороз.

тест-растения. Симптомов выявлено не было. DMGMV удалось передать *M. persicae* с больного растения *C. maxima* сорта Ананасная на здоровые растения *C. pepo* var. *patisson* сорта Солнышко и *C. maxima* сорта Ананасная. Инфицированной тлей заражали растения *N. tabacum* cv. Samsun. Симптомы вирусного поражения на растениях не отмечены.

Провели проверку семенной передачи DMGMV у зараженных растений *P. hybrida*. Растения, выросшие из семян больных растений, имели симптомы вирусного поражения. Изучили физические свойства вируса: ТТИ – 50–55 °С, ПРС – 10⁻⁴–10⁻⁵, ПСИ – 1 сут. При просмотре препаратов, приготовленных из сока зараженных растений, под электронным микроскопом были обнаружены нитевидные частицы, размер которых соответствовал 640 нм. Кроме того, в ультратонких срезах *P. hybrida*, зараженной изучаемым изолятом DMGMV, найдены вирусные включения типа “pinwills”, являющиеся характерным признаком вирусов, относящихся к роду *Potyvirus* (работа выполнена Ю.В. Богуновым).

Установлено антигенное родство исследуемого DMGMV с вирусами рода *Potyvirus* – *Tobacco etch virus* и *Potato virus Y*. Как отмечалось выше, георгины, по

литературным данным, заражаются вирусами пяти родов – *Cucumovirus*, *Potexvirus*, *Tospovirus*, *Iarvirus* и *Caulimovirus*. По биологическим и антигенным свойствам выявленный нами вирус ни к одному из них отнести нельзя. Данные по изучению морфологии и размеров вирусных частиц; симптоматологии и круга поражаемых растений, положительной реакции изучаемого *DMGMV* с антисывороткой против вирусов рода *Potyvirus*; физическим свойствам вирионов, передачи вируса тлями и сравнительный анализ литературных с нашими результатами свидетельствуют о том, что нами впервые на ДВ России выявлен из георгины сорта Юра *Dahlia mild green mottle virus*. Это новый для георгины вирус рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*. Вероятнее всего, он занесен на юг ДВ двумя путями: либо с посадочным материалом, либо на растение тлями из дикой флоры. В последние годы на российский ДВ официально ввозится огромное количество посадочного материала из-за рубежа. Учитывая, что посадочный материал закупается коммерчес-

кими структурами по низким ценам, а это зачастую отработанный или выбракованный, то велика вероятность заноса материала, пораженного вирусами, а 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 материала и мониторинг фитосанитарного состояния интродуцированных культур, их видов и сортов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, многолетними исследованиями показано, что на ДВ России на георгинах самым распространенным и вредоносным является *Cucumber mosaic cucumovirus* семейства *Bromoviridae*. Второй по распространенности и вредоносности – узкоспециализированный *Dahlia mosaic caulimovirus* семейства *Caulimoviridae*. Идентифицирован новый для рода *Dahlia* сав. *Dahlia mild green mottle potyvirus* семейства *Potyviridae*.

Авторы благодарят Ю.В. Богунова за проведенный скрининг сортов георгинов и детекцию ПЦР при изучении *DMV* и за участие в работе по идентификации *DMGMV*, В.К. Вишниченко за определение групповой принадлежности приморских изолятов *CMV* методом ПЦР, а также признательны Т.Ф. Коцарь за поставляемый материал из частных коллекций.

ЛИТЕРАТУРА

- Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. Киев, 1988. 550 с.
- Богунов Ю.В. Идентификация вируса мозаики георгины молекулярно-биологическими методами // Мол. биол. 2006. Т. 40, № 1. С. 184–185.
- Богунов Ю.В., Гнутова Р.В. Результаты и перспективы изучения вируса цветной капусты // Вестн. ДВО РАН. 2002. № 3. С. 118–126.
- Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М., 1985. 183 с.
- Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. М., 1993. 301 с.
- Гнутова Р.В. Таксономия вирусов растений Дальнего Востока России. Владивосток, 2009. 462 с.
- Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. Вирусы и их штаммы, поражающие овощные культуры (дальневосточные изоляты) // Агроеколог. журн. 2002. Спецвыпуск. С. 6–14.
- Коев Г.В., Клешнена Л.Г., Махартов В.В. Болезни цветочных культур. Кишинев, 1985. 58 с.
- Макутенайте-Навалинскаене М.К. Вирусные и микоплазменные болезни цветочных растений. Вильнюс, 1981. 70 с.
- Развязкина Г.Т., Полякова Г.П., Штейн-Марголина В.А. Упрощенный метод обнаружения вирусных частиц из сока больных растений // Вопросы вирусологии. 1968. № 5. С. 633–635.
- Толкач В.Ф. Идентификация и биологическая характеристика поти- и тобамовирусов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 1995. 24 с.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Растения семейства *Orchidaceae*, пораженные вирусом огуречной мозаики // Изв. ТСХА. 2007. № 4. С. 165–173.
- Толкач В.Ф., Чернявская Н.М., Гнутова Р.В. Вирус мозаики арбуза – новый патоген для дальневосточного региона // Вестн. защ. раст. 2001. № 3. С. 40–45.
- Толкач В.Ф., Гнутова Р.В. Вирус огуречной мозаики, выявленный на овощных культурах (хабаровские изоляты) // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2008. № 10. С. 29–37.
- Чернявская Н.М. Штаммовый состав вирусов, поражающих овощные культуры на Дальнем Востоке России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2003. 24 с.
- Bercks R. *Potato X virus* // CMI/AAB Descriptions Plant Viruses. 1970. N 4. 4 p.
- Boonham N., Smith P., Walsh K. et al. The detection of *Tomato spotted wilt virus (TSWV)* in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (Taq Man) // J. Vir. Methods. 2002. V. 101. P. 37–48.

- Brunt A.A. *Dahlia mosaic virus* // CMI/AAB Descriptions Plant Viruses. 1971. N 51. 4 p.
- Brunt A.A., Crabree K., Dallwitz M.J. et al. *Tobacco streak virus ilarvirus* // Plant Viruses Description and Lists from the VIDE Database. 1997. P. 1271–1274.
- Fauquet C.M., Mayo M.A. *Tomato spotted wilt virus* из рода *Tospovirus* // Arch. Virol. 2001. N 146. P. 189–194.
- Kameya-Iwaki M. *Dahlia mosaic virus (Caulimovirus)* // Plant Viruses in Asia. Yogyakarta. 1998. P. 560–562.
- 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. V. 84. P. 249–258.
- Navalinskiene M., Samuitiene M. Dekoratyviniu augalu virusines ligos ir ju sukelejai lietuvoje. Kaunas, 2006. 254 p.
- Nesmelov I.B., Gnutova R.V., Tolkach V.Fh. Phylogenetic analysis of a new group of orchid isolates *CMV* from Far East Russian based on 2b gene sequencing // Abstr. MAPEEG-2009. Vladivostok, 2009. P. 38.
- Pappu H.R., Wyatt S.D. Viral Diseases of *Dahlia*. A web page with information on diagnosis and management of viral diseases of dahlia. 2008. <http://dahlia.wsu.edu>
- Tolkach V.F., Gnutova R.V. The new for South Far East Russia of *Caulimovirus: cauliflower mosaic and dahlia mosaic* // Abstr. VIIth Intern. Symp. Plant Virus Epidemiology. Aschersleben. 2002. P. 123.