

ВІРУСИ ТА ВІРУСНІ ХВОРОБИ РОСЛИН РОДУ *CORYLUS* L. В ЕКОЛОГІЧНИХ УМОВАХ НДП «СОФІЇВКА» НАНУ

Розглянуто методи діагностики вірусів представників роду *Corylus*. Виявлено донорські безвірусні рослини та подано результати досліджень розподілу вірусної інфекції серед видів і форм різного походження.

Вступ

Останнім часом в різних екологічних регіонах України набули поширення вірусні хвороби які викликають значні патології у рослин. В результаті чого ці деструктивні процеси привертають до себе увагу ботаніків, фітопатологів та вірусологів усього світу, оскільки є причиною значних економічних втрат урожайності цієї цінної культури.

На сьогодні відомо більше 600 патогенів здатних паразитувати на рослинах, а шкодочинність окремих патогенів плодкових культур може сягати 20–60% втрат урожаю. При цьому значних економічних збитків завдають як окремі віруси, так і їхня комплексна інфекція. За цих умов патогени вірусної природи, впливають на більшість фізіологічних процесів інфікованої рослини. На відміну від інших інфекційних захворювань, вони мають низку особливостей: в інфікованій рослині віруси репродукуються протягом усього її життя, а також у її вегетативному (для деяких патогенів — і генеративному) потомстві. Це призводить до накопичення вірусів у продукції рослинництва та насінневого матеріалі, а також у навколишньому середовищі (в агроценозах), підсилюючи і без того високий інфекційний фон. Крім того, інфіковані саджанці при виході з розсадника розширюють ареал збудників вірусних хвороб і коло уражених ними рослин [1]. Ось чому в розсадництві особливу увагу слід звертати на фітовірусологічний стан маточно-насіньових і живцевих садів та маточників клонових підщеп. Основним способом розповсюдження фітовірусів є їх передача від рослини до рослини ще й з пилком і насінням, а деякі мають переносників (комахи, кліщі, нематоди), серед яких важливу роль відіграють попелиці [9,10]

Симптоми, які викликаються вірусом певної таксономічної групи, в значній мірі залежать від виду чи сорту рослини, штаму вірусу та факторів оточуючого середовища (температури, інтенсивності освітлення тощо) [15]. Не менш важливими чинниками є і всі ті процеси які на сьогоднішній день є поширення та шкодочинність вірусів, появи їх нових «варіантів» та вплив на них антропогенних факторів, таких як:

- Руїнування природних екосистем.
- Інтенсивна модифікація/експлуатація природного середовища.
- Безвідповідальне ставлення до біотехнологічних процесів різного спрямування, та ін.

Іноді рослини, уражені вірусами, можуть взагалі не проявляти видимих симптомів. Крім того, такі фактори як незбалансованість елементів мінерального живлення, їх нестача, висока інтенсивність освітлення, інвазії комахами та кліщами, бактеріальні та грибні ураження чи генетичні порушення можуть викликати симптоми, схожі з симптомами вірусної інфекції. Тому діагноз «вірусна інфекція» повинен бути підтверджений сучасними методами діагностики захворювань та ідентифікації їх патогенів.

Необхідно відмітити, що хоча рослини роду *Corylus* досить стійкі до хвороб та ураження різноманітними шкідниками, все ж таки останнім часом їх активність та поширення значно зросли. Зважаючи на збитки, які завдають вірусні хвороби, основним напрямом розвитку садівництва в Україні є переведення його на безвірусну основу [4]. Тому метою наших досліджень було вивчення фітовірусологічного стану насаджень плодкових та декоративних культур роду *Corylus* в умовах НДП

«Софіївка» НАН України різними сучасними методами діагностики.

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили у 2010–2014 рр. на базі лабораторії мікроклонального розмноження Національного дендрологічного парку «Софіївка» НАН України, лабораторії вірусології Інституту садівництва (ІС) НААН, лабораторії кафедри вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка та з метою вивчення фітовірусологічного стану дослідних насаджень плодкових та декоративних культур роду *Corylus* і добору безвірусних зразків для створення бази безвірусних клонів та впровадження у виробництво високоякісного садивного матеріалу.

Об'єктами досліджень були зразки представників роду *Corylus* на території НДП «Софіївка» НАН України. Багато дослідників вважають однією з основних причин ослаблення насаджень — ураження рослин ліщини різноманітними вірусними хворобами [8]. Відзначають, що найтяжчі наслідки зафіксовано при пошкодженні листя в ранньовесняний період. Крім того, до складу насаджень природного походження, як правило, входять супутні види дерев і кущів, які також є резервуарами для зберігання вірусів [14, 16].

Тому, в наших дослідженнях зразки відбиралися як за візуальними симптомами, так і без жодних проявів вірусних ознак, — рендомізовано [9]. Відбір зразків та візуальний огляд декоративних та плодкових насаджень рослин роду *Corylus* ми проводили згідно загальноприйнятих методик [3, 5, 10].

Обстеження насаджень проводили по двох діагоналях і чотирьох сторонах досліджуваної ділянки. Маточно-живцеві, колекційні та сортові насадження оглядали двічі на рік: навесні — при повному розвитку перших трьох–чотирьох листків, та наприкінці літа — друга хвиля росту плодкових дерев та дозрівання плодів [5]. При обстеженні дерев оглядали крону кожного дерева, особливо з північного боку, де симптоми яскравіше проявляються і довше зберігаються під час літньої спеки. Проби відбирали рівномірно з чотирьох боків дерева з гілок, розміщених у внутрішній частині крони ближче до штамба на висоті не більше 2-х метрів. Відбирали верхню частину пагона з молодими листками. Ті рослини, в яких не виявлено зовнішніх ознак вірусних захворювань включали в перевірку на латентне вірусносієство. Відібрані зразки упаковували в поліетиленові пакети

з етикетками із зазначенням сорту дерева, місця і дати відбору. Надалі зразки відразу детектували на наявність вірусної інфекції методом ІФА. Для зберігання листя та їх гомогенатів додержували температуру в холодильнику $+2\text{ }^{\circ}\text{C} - +4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Наступним етапом нашої роботи було біологічне тестування на вірусносієство відібраних зразків за допомогою трав'янистих рослин-індикаторів. Проводили його методами біопроб на рослинах-індикаторах. Матеріалом для тестування в основному слугували молоді листки рослин. Біологічне тестування зразків на наявність вірусу мозаїки яблуні проводили на рослинах *Cucumis sativus* L. та *Phaseolus vulgaris* L., *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana tabacum* cv. **Samsun**; на наявність вірусу некротичної кільцевої плямистості та вірусу хлоротичної кільцевої плямистості — на рослинах *Chenopodium quinoa* Willd [5]. Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), чутливими до даного вірусу є наступні рослини: *Nicotiana tabacum* L., *Datura stramonium* L., *Nicotiana glutinosa* L. Тоді як чутливими до карлавірусу були: *Chenopodium album*, *Nicotiana debney* L., *Datura metel* L. Індикаторні рослини вирощували в теплицях за звичайних параметрів вологості, температури, освітлення, в ящиках з проавтоклаваною універсальною ґрунтовою сумішшю. Рослини висаджували одну від одної на відстані 10 см.

Для кожного дослідження використовували не менше трьох-п'яти рослин. Механічне ураження листя трав'янистих індикаторів проводили попередньо ретельно розтертим рослинним матеріалом (молоді листки) в фарфоровій ступці з додаванням фосфатного буферу з рН 7,2, який дозволяє стабілізувати лабільні віруси плодкових культур і підтримувати рН розчину в межах, близьких до нейтральних. Для приготування інокулюма використовували фосфатний буфер з додаванням ніотинової кислоти, тоді як для механічної інокуляції рослин-індикаторів використовували фосфатно-сольовий буфер з рН 8,0 та додаванням 1% ніотинової кислоти, 0,25% діетилдитіокарбому натрію (DIECA) та 0,2% NaSO_3 [3].

Рослини інокулювали механічно за допомогою скляної палички з додаванням абразиву (карборунду) або уколом в жилку в основі листка соком рослин, що мали симптоми вірусного ураження. Контрольні рослини інокулювали буферним розчином, який використовувалися для гомогенізації рослин.

Для підвищення чутливості рослин до вірусу після інфікування їх ставили в темне місце на 24–48 годин.

Задля виявлення та фіксації внутрішньоклітинних включень нами в основному було використано метод люмінесцентної мікроскопії. Для приготування зразків брали нижній міжжилковий епідерміс листка представників роду *Corylus* з симптомами хвороби. Фарбування проводили за методикою Гімза та інш. методиками для світлової мікроскопії в розведенні (1:1000), акриловий оранжевий та інші барвники. З листків із симптомами знімали нижній міжжилковий епітелій та занурювали його в 1,5% розчин трихлороцетової кислоти на 3 хвилини, для фіксації зразка. Потім промивали в дистильованій воді та розглядали на предметному скельці під мікроскопом. Включення фіксувались за допомогою спеціально облаштованої фотокамери, при цьому зображення також переносилось на екран монітору комп'ютера.

З метою своєчасного відбракування хворого та відбору здорового посадкового матеріалу, оцінки стійкості вихідних форм та продуктів селекції при виведенні вірусостійких сортів культурних рослин застосовують серологічні методи діагностики вірусних інфекцій зокрема методом ІФА.

В процесі наших досліджень тестування рослин роду *Corylus* на наявність вірусних антигенів методом ІФА (Імуноферментний аналіз) проводили методом класичного ІФА в модифікації сендвіч. В основу методу покладено принцип використання мічених ферментом антитіл. Основним ферментом для проведення аналізу рослинного матеріалу була лужна фосфатаза. Ідентифікацію вірусів за допомогою ІФА проводили з комерційними тест-системами LOEWE (виробництва Німеччини) згідно рекомендацій виробника. Для аналізу використовували зелені листки та бруньки попередньо подрібнені та розтерті із додаванням кон'югатного буферу до гомогенного стану у ступці з пестелем.

Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Start Fax 2100 (Awarenes Technology, США) при довжині хвилі 405 нм (для АТ, мічених лужною фосфатазою). За позитивний приймався показник Е 405, що втричі перевищував показник негативного контролю.

Для визначення наявності вірусу в очищених зразках використовували метод електронної мікроскопії. Для приготування плівки-підкладки

застосовувався 0,2%-ний розчин формвару. Крім того, зразки досліджували у електронному мікроскопі марки JEM-1400 (Japan) та EM-125 (Суми, Україна) при чому, в окремих дослідах використовували підготовку препаратів із розбавленої суспензії, методом «занурення» [7].

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведених нами обстежень дослідних, виробничих та декоративних насаджень представників роду *Corylus* на території НДП «Софіївка» НАНУ, а також завдяки використаним методам досліджень було встановлено, що найпоширенішими були віруси вірус мозаїки яблуні (ВМЯ) або *Apple mosaic virus* (ApMV), вірус хлоротичної кільцевої плямистості (ВХКП) або *Chlorotic ringspot virus* (HCRSV), вірус некротичної кільцевої плямистості (ВНКП) або *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) крім того мала місце змішана вірусна інфекція.

Згідно літературних даних найбільш чутливими до вірусних інфекцій є такі найбільш розповсюджені види ліщин як: *Corylus avellana* та *Corylus maxima* [16]. Нами також спостерігалась така тенденція.

Симптоми, викликані вірусом мозаїки яблуні на більшості рослин проявляються на листках у вигляді яскраво-жовтих плям, смуг уздовж жилок. Характерними є світло-жовті плями, кільця, добре помітні при яскравому світлі. На деяких видах збудник захворювання тривалий час (2–3 роки) може знаходитися в латентній формі. Проявляються симптоми мозаїки відразу після появи листя. Найбільш чітко прояв симптомів відмічається в травні–червні, а з настанням спекотних днів симптоми маскуються [11]. Ознаки, які проявляються при ураженні вірусами, можна переплутати з симптомами, які проявляються при дії токсичних речовин (гербіциди, ростові речовини) або нестачі деяких мікроелементів (цинк, бор, залізо). Тому через подібність симптомів, які виникають з різних причин, при візуальному дослідженні не завжди вдається одержати об'єктивну оцінку стану дерев. Головною проблемою при візуальній діагностиці є латентність — рослини можуть бути ураженими і становити небезпеку для використання їх як маточних дерев, при відсутності жодних проявів вірусної інфекції [10].

Хлоротична кільцева плямистість з'являється вздовж судин ураженого листя, характерні симптоми за якими було названо захворювання [16].

На деревах утворюються дрібні вузькі деформовані листки, ріст молодих пагонів гальмується. Ознаки

хвороби проявляються на окремих гілках або охоплюють усе дерево (Рис. 1).



Рис. 1. Симптоми хлоротичної мозаїки на листках *C. maxima* Mill. (Ліщина велика) та на рослинах фундуку (сорт Ювілейний)

На деяких деревах гілки оголюються і тільки на їх кінцях утворюються розетки вузьких і жорстких листків. У найчутливіших сортів можуть висохати окремі гілки, у менш сприятливих — на

деформованих, а також на нормальних за формою листках утворюються хлоротичні кільця, смуги, дубоподібний візерунок і крапчастість (Рис. 2).



Рис. 2. Симптоми кільцевої плямистості на рослинах *Corylus avellana*

ВНКП вірус некротичної кільцевої плямистості — симптоми з'являються на листовій пластинці у вигляді невеличких прозорих некрозів округлої форми. Іноді утворюється вузька хлоротична облямівка. Симптоми зустрічаються на листях усіх ярусів, по мірі розвитку рослини величина некрозу збільшується, некротична пляма набуває неправильної форми, висохлий листок у місці некрозу розривається, що призводить до утворення отворів [11]. Характерні ознаки хвороб — наявність на листках світло-зелених

концентричних кілець і смуг. Діаметр кілець залежно від хвороби та сорту становить від 1–2 мм до 1 см. В середині кілець тканина відмирає і з часом випадає. Листки стають дірчастими. Іноді від них залишаються тільки центральні та бокові жилки. Ці ознаки слід відрізняти від пошкоджень шкідниками та ураження клястероспоріозом [11] (Рис. 3).

Результати тестувань методом біопроб на трав'янистих рослинах-індикаторах свідчать про те, що швидко і надійно проявляються симптоми

на *Chenopodium quinoa* (лобода рисова) при тестуванні на віруси хлоротичної плямистості листя яблуні, борознистості деревини, скручування листя, латентної кільцевої плямистості; на *Cucumis sativus* при виявленні вірусів некротичної кільцевої плямистості, карликовості сливи і мозаїки яблуні [12]. Безсимптомний перебіг інфекції

відмічається на наступних рослинах: *Beta vulgaris*, *Datura stramonium*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Nicotiana glauca*. В результаті проведених досліджень нами було виявлено, що для біотестування найкращими рослинами є *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana glauca* cv. Samsun та *Cucumis sativus* [15].



Рис. 3. Симптоми некротичної кільцевої плямистості на рослинах *Corylus colurna* L. та *C. heterophylla* Fisch.

При інфікуванні спостерігалася специфічна реакція на рослинах-індикаторах, а саме невеликі хлоротичні локальні ураження, системні смуги та жовтуваті плями на сім'ядолях, деформація справжнього листка крапчатість, пригнічення росту.

Метод люмінесцентної мікроскопії дав нам можливість спостерігати внутрішньоклітинні включення. Завдяки чому ми зробили попередній висновок про можливу наявність у деяких відібраних нами зразків ліщини, супутніх рослин та рослин-індикаторів вірусної інфекції (Рис. 4, 5).

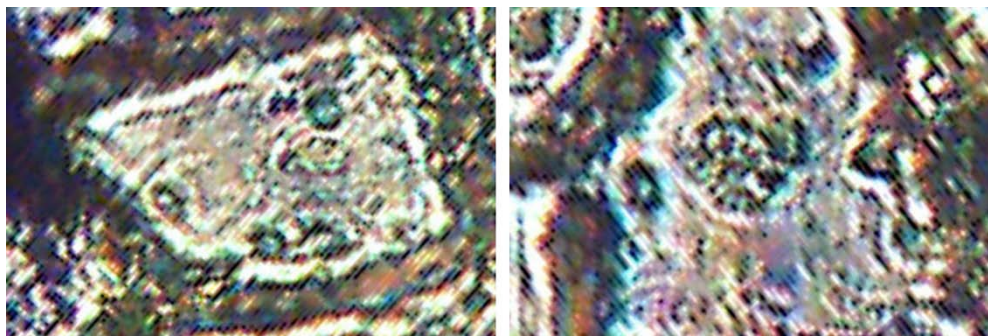


Рис. 4. Внутрішньоклітинні включення в зразках листя *C. colurna* ураженого вірусом ВТМ

За результатами ІФА серед протестованих дерев з насаджень НДП «Софіївка» виявлено антиген ВНКП в 68,4% досліджуваних зразків, антиген вірусу ВМЯ в 23,3%, антиген вірусу ВЖКП в 18,3%, окрім того, наведені результати свідчать, що мала місце змішана вірусна інфекція в 1,7% досліджуваних зразків.

Таким чином, результати тестування методом рослин-індикаторів, ІФА та електронної мікроскопії виявили широке розповсюдження вірусних інфекцій серед протестованих зразків представників роду *Corylus*. Чіткої закономірності розподілу вірусної інфекції серед видів, форм чи сортів різного походження виявлено не було.



Рис. 5. Внутрішньоклітинні включення в зразках листя *C. avellana* ураженого вірусом ВТМ

Електронномікроскопічні дослідження показали наявність в препаратах, отриманих з соку досліджуваних рослин *Corylus* гнучких паличковидних часток довжиною $\approx 550\text{--}640$ нм (*Carlavirus*) та ізометричних часток діаметром $29\text{--}32$ нм (*Ilarvirus*). При цьому, під час інюкуляції рослин-індикаторів соком даних рослин розвивалися симптоми, характерні для представників роду *Ilarvirus*, *Tobamovirus*, *Carlavirus*.

На фото 6–7 добре видно короткі та паличковидні віруси виділені з рослин, представників роду *Corylus*, які уражують рослини в змішаній інфекції.

Висновки

Завдяки використанню комплексу методів детекції вірусів можна ідентифікувати патоген, що є причиною певної зовнішньої аномалії в рослин. Зважаючи на те, що кожен патоген має досить чіткий та специфічний характер в уражених рослинах, а рослини-індикатори на віруси, що передаються з соком, мають досить специфічну реакцію, то в результаті отриманих даних можна провести ідентифікацію збудників. Крім того ми можемо спостерігати внутрішньоклітинні включення використовуючи люмінесцентну мікроскопію, і вже на підставі цих даних маємо змогу провести ідентифікацію збудників.

Вегетативне розмноження сортів і видів плодкових та декоративних дерев, латентна форма та відсутність зовнішніх симптомів багатьох вірусних хвороб, так само як неконтрольоване розповсюдження їх природнім шляхом, та ввезення садивного матеріалу з-за кордону без вірусологічного контролю тільки сприяє та збільшує розповсюдження цих хвороб в Україні. Саме тому єдиним методом запобігання подальшому розповсюдженню вірусних хвороб в розсадниках нашої країни — є переведення

розсадництва на безвірусну основу, створення системи розмноження безвірусного садивного матеріалу та його сертифікації.

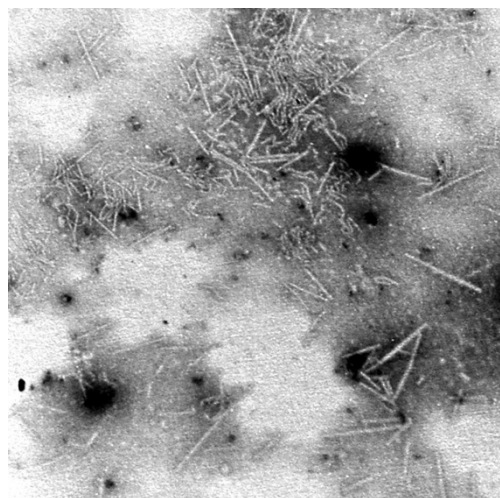


Рис. 6. Електроннографія продовгуватих вірусних часток за умов змішаної інфекції у рослин роду *Corylus*

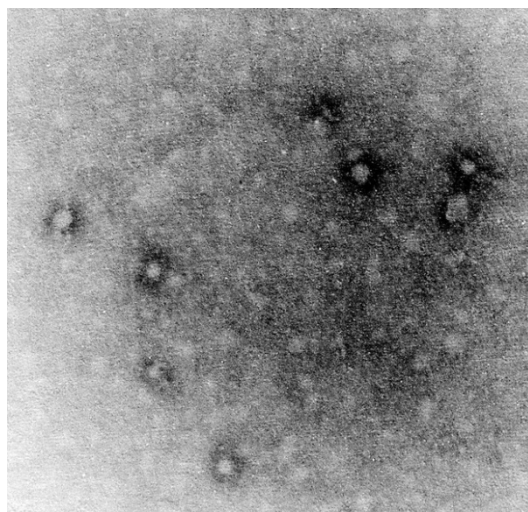


Рис. 7. Електроннографія сферичних вірусних часток із рослин роду *Corylus*

Перелік посилань

1. Бойко А.Л. Экология вирусов растений / А.Л. Бойко. — К.: Выща школа, 1990. — 164 с.
2. Болезни сельскохозяйственных культур: в 3 т. / [под ред. Пересыпкин В.Ф.]. — К.: Урожай, 1989. — Т. 2: Болезни овощных и плодовых культур. — 1989. — С. 59–87.

3. *Борьба с вирусными болезнями растений / Пер. с нем. Г.И. Лойдиной. Под ред. И с предисл. И. Г. Атабекова и В. А. Шмыгля. — М.: Агропромиздат. — 1986. — С.326–357.*
4. *Васюта В.М. Перспективи створення сучасної системи вирощування безвірусного сертифікованого садівного матеріалу плодкових і ягідних культур в Україні / В.М. Васюта, В.М. Удовиченко // Садівництво: міжвидовий тематичний науковий зб. — К.: Аграрна наука, 2004. — Вип. 55.*
5. *Вердеревская Т.Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т.Д. Вердеревская, В.Г. Маринеску. — Кишинев: Штиинца, 1985. — С. 236–285.*
6. *Вірусні хвороби сільськогосподарських культур / С.М. Московець, А.Д. Бобир, Л.Ю. Глушак, А.М. Онищенко. За ред. А.Д. Бобиря. — К.: Урожай, 1975. — 152 с.*
7. *Вірусологія в електроннографіях: Альбом / За ред. академіка НААН та АНВШ України, д.б.н., професора А.Л. Бойка. — К.: ДІА, 2012. — 56 с.: іл.*
8. *Контамінація рослин роду Corylus L. в процесі їх онтогенезу вірусами різних таксономічних груп / [Тарасенко Г. А., Косенко І. С., Небиков М. В., Бойко А. Л.] // Роль ботанічних садів і дендропарків у збереженні та збагаченні біологічного різноманіття урбанізованих територій: Матеріали міжнародної наукової конференції (Київ, 28–31 травня 2013 р.) — Гол. ред. В.Г. Радченко. — К.: НЦЕБМ НАН України, ПАТ «Віпол», 2013. — 304 с.*
9. *Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин: Учеб. пособие [для биологич. спец. вузов]. — [3-е изд. перераб. и доп.]. — М.: Высшая школа. — 1980. — 293 с.*
10. *Мэтьюз Р. Вирусы растений / Р. Мэтьюз; под ред. И.Г. Атабекова. — М.: Мир, 1973. — 469 с.*
11. *Рыжков В. Л., Проценко А. Е. Атлас вирусных болезней растений / В.Л. Рыжков, А.Е. Проценко. — М.: Наука, 1968. — 136 с.*
12. *Технологический процес получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур: методологические указания / Под ред. В.И. Кашина. — М.: ВСТИСП, 2001. — 109 с.*
13. *Шмыгля В. А. Типы инфекционного процесса вируса табачной мозаики и диагностика зараженности растительного материала / В.А. Шмыгля. // Научные доклады высшей школы. Биол. науки. — 1987. — № 6. — С.22–28.*
14. *Dragoljub D. Sutic, Richard E. Ford and Malis T. Tomic. Handbook of Plant Virus Diseases. — USA.: CRC Press, 1999. — 553 p.*
15. *Fulton R. W. Apple mosaic virus / R. W. Fulton // CMI/AAB. Descrip. of Pl. Viruses. — 1983, № 275. — P.39–48.*
16. *Sökmen M. A. Samsun'da findik (Corylus avellana L.) alanlarının elma mozayik virüsü (ApMV) ile bulaşıklık durumunun belirlenmesi // Bitki Koruma Bölümü. Samsun. — 2005. — № 3 — p. 22–24.*

Рекомендував до друку В.М. Грабовий

Г.А. Тарасенко
 Национальный дендрологический парк «Софиевка» НАН
 Украины

ВИРУСЫ И ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ РАСТЕНИЙ РОДА *CORYLUS* L. В ЭКОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ НДП «СОФИЕВКА» НАНУ.

Рассмотрены методы диагностики вирусов представителей рода *Corylus*. Выявлены донорские безвирусные растения и подано результаты исследований распределения вирусной инфекции среди видов и форм разного происхождения.

G. A. Tarasenko
 National dendrological park «Sofiyivka» of NAS of Ukraine

VIRUSES AND VIRAL DISEASES OF PLANTS OF THE GENUS *CORYLUS* L. AT THE ECOLOGICAL CONDITIONS OF NDP «SOFIYIVKA» NAS OF UKRAINE.

Theoretical principles and training usage of serological detection of representatives of the genus *Corylus* L. using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are examined in the article. The investigation results as for the distribution of viral infection among the species and forms of representatives of the genus *Corylus* L.