

ТЕСТУВАННЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ДЕЯКИХ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН ІЗ РОДИН *ASTERACEAE* ТА *LAMIACEAE*

А. В. Дашенко, здобувач*

*Проведено моніторинг і тестування вірусних інфекцій окремих лікарських рослин родин айстрових та губоцвітих у Лісостеповій зоні України. Методами візуальної діагностики, біологічного тестування й електронної мікроскопії встановлено ураження вірусами лікарських рослин ехінацеї пурпурової, лофанту анісового та м'яти перцевої на виробничих плантаціях. Інфекційна природа виявленого захворювання ехінацеї доведена за тріадою Коха, а вірусна етіологія – методом біологічного тестування й електронної мікроскопії. Встановлено можливість використання гібрида санберрі (*Solanum retrofléxum*) як рослини-індикатора вірусних хвороб лікарських рослин.*

Ключові слова: *вірусні хвороби, ехінацея пурпурова, лофант анісовий, м'ята перцева, візуальна діагностика, біологічне тестування, електронна мікроскопія*

Захист рослин у лікарському рослинництві посідає чільне місце серед заходів щодо збільшення виробництва лікарської рослинної сировини. Лікарське рослинництво дає змогу забезпечити сталюю сировинною базою дедалі зростаючі потреби фармацевтичної промисловості й знизити собівартість лікарської рослинної сировини. Штучне вирощування лікарських рослин – найдійовіший спосіб охорони рідкісних і зникаючих лікарських рослин. У культурі лікарські рослини, як правило, пошкоджуються різноманітними шкідниками, уражуються збудниками грибної, бактеріальної та вірусної етіології. Надійно захистити їх від

*Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор, член-кореспондент НААН України В. П. Петренкова

вірусних інфекцій може тільки комплекс заходів, що визначається видовим складом вірусів, переносників та їхніми біоекологічними характеристиками.

Щоб запобігти поширенню інфекції та знизити шкідливість захворювання до господарсько допустимого рівня, потрібно дотримуватись норм профілактики на всіх етапах технологічного процесу, в тому числі використовувати здоровий насіннєвий матеріал. Проте інформація стосовно поширення і видового різноманіття вірусів, які уражують лікарські рослини на території України, є недостатньою [3]. Вивчення етіології захворювань дасть можливість розробити ефективні методи захисту рослин, а також зберегти врожай та якість сировини для фітофармацевтики.

Оскільки діагноз захворювання рослин лише за візуальними ознаками не завжди точний, цим методом можна обмежитися тільки в тому разі, якщо симптоми ураження вірусом характерні для нього. У практиці часто трапляються випадки, коли одні й ті ж самі або дуже подібні ознаки ураження спричиняються різними чинниками [7]. Тому для підтвердження (або спростування) попереднього діагнозу захворювання разом із зовнішнім оглядом необхідно застосовувати додаткові методи. Одним з них є біологічне тестування. Зокрема, цим методом було виявлено відмінності ізолятів вірусу томатної мозаїки (ВТМ), виділених із рослин подорожника, вирощених у різних областях України [12]. Біологічне тестування також використовували для підтвердження вірусної етіології хвороб смородини чорної та малини [10].

Мета дослідження – провести моніторинг вірусів, що уражують окремі лікарські рослини родини *Asteraceae* та *Lamiaceae* у Лісостеповій зоні України і вивчити деякі їхні біологічні властивості.

Матеріали і методи дослідження. Метод інокуляції соком хворої рослини придатний для передачі на здорові рослини лише тих вірусів, які можуть поширюватися контактним-механічним способом [5]. Для приготування соку використовували листки хворих рослин з чіткими симптомами захворювання. Дрібно нарізане листя розтирали в ступці з

додаванням невеликої кількості води й абразиву (мелене скло, карборунд, дрібний пісок та ін.). Потім із розтертої маси відтискали сік через подвійний шар марлі та втирали його у листок здорової рослини пальцем, ватним тампоном або шпателем. Інокульовані рослини поміщали під прозорі ізолятори і спостерігали за появою через певний час симптомів захворювання.

Інфекційну природу виявлених захворювань встановлювали за допомогою методу рослин-індикаторів (біологічне тестування). Як інфекційний матеріал використовували сік хворих лікарських рослин із родин айстрових (ехінацеї) та губоцвітих (лофанта, м'яти). Наважку рослинного матеріалу (5–10 г) подрібнювали й розтирали в ступці з додаванням 0,1М фосфатного буфера рН 7,0 у співвідношенні 1:2. Одержаний гомогенат фільтрували.

Для запобігання інактивації вірусів у середовище для екстрагування додавали відновлювач (β -меркаптоетанол). На листки рослин-індикаторів наносили порошок карборунду і проводили інокуляцію вірусомісним матеріалом (сік хворих дослідних рослин). Надлишок інокульому змивали водою, після цього рослини-індикатори витримували протягом доби в затіненому місці з подальшим вирощуванням їх в умовах теплиці [4, 6]. Контролем слугували незаражені рослини, «інокульовані» безвірусним буферним розчином. Повторюваність дослідів п'ятиразова.

Біологічне тестування здійснювали шляхом механічної інокуляції рослин-індикаторів у фазі 4–6 справжніх листків. Рослинами-індикаторами слугували *Datura stramonium* L., *D. metel* L., *Nicotiana tabacum* L. сорту Імунний, *N. glutinosa*, *Gomphrena globosa* L., *Solanum nigrum* L., *Chenopodium album*, *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyen., *Phaseolus vulgaris* L. сорту Пінто, *Vicia faba* L., а також санберрі (*Solanum retrofléxum*).

Морфологію вірусних часток вивчали методом електронної мікроскопії. Негативне контрастування очищених вірусних препаратів

проводили 2%-ним розчином фосфорновольфрамової кислоти протягом 2 хв [8]. Препарати досліджували електронними мікроскопами JEM-1230 (JEOL, Японія) та EM-125 (Суми, Україна). Ураженість визначали за [11].

Результати досліджень. При обстеженні посівів лікарських рослин у Полтавській і Київській областях нами було виявлено високу ураженість рослин ехінацеї (до 70–80 %) зі ступенем їх ураження 5 балів (за 6-бальною шкалою). У фазу бутонізації спостерігали симптоми хлоротичної мозаїки, деформації листкової пластинки у вигляді скручування, опуклості та горбистості (рис. 1).



Рис. 1. Польові посіви ехінацеї у фазу бутонізації з симптомами вірусної інфекції

Поступово світло-зелена хлоротичність на листках у фазу початку цвітіння переходила у жовту плямистість, що займала майже всю листкову пластинку у фазу закінчення цвітіння культури. У фазу цвітіння виявлено яскраво виражені симптоми вірусної інфекції на рослинах ехінацеї (рис. 2).

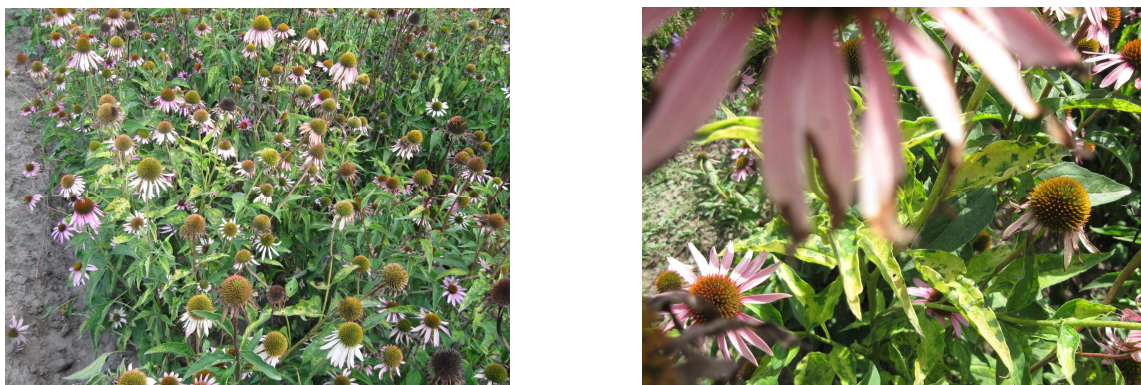


Рис. 2. Яскраво виражені симптоми вірусної інфекції на листках ехінацеї у фазу цвітіння

Властивості вірусів вивчали методом біологічного тестування на рослинах-індикаторах. Серед використаних індикаторів на ураження соком із хворих рослин ехінацеї прореагували *D. stramonium* та *Chenopodium quinoa*.

На 20-й день після інокуляції на листках *Ch. quinoa* з'являлися локальні некрози світло-коричневого кольору з темно-коричневим ореолом діаметром 2–3 мм (рис. 3).



Рис. 3. Некротична реакція на листках *Chenopodium quinoa*, інфікованих соком уражених рослин ехінацеї (праворуч – контроль)

Результати проведеного нами біологічного тестування збігаються з дуже обмеженими літературними даними [3]. Автором також виявлено дрібні локальні некрози розміром близько 1 мм на рослинах *Chenopodium hybridum*, заражених соком із листків ехінацеї.

Рослини *Datura stramonium* на 14-й день прореагували появою системної реакції у вигляді жовто-зеленої мозаїки листкової пластинки, пожовтіння та скручування молодих листків.

Наступним завданням нашої роботи було встановлення інфекційної природи захворювання за тріадою Коха. Для цього проведено: 1) передачу інфекції від уражених польових зразків на здорові рослини ехінацеї (штучна інокуляція здорових рослин соком рослин уражених у лабораторних умовах); 2) передачу інфекції від штучно ураженої ехінацеї на рослину-індикатор *Chenopodium quinoa* (інокуляція індикатора соком ехінацеї); 3) зворотну передачу інфекції від рослини-індикатора на здорові зразки ехінацеї

(інокуляція рослин ехінацеї соком *Chenopodium quinova*). Ідентичність симптомів ураження вихідних рослин з поля, штучно інокульованих у лабораторії, а також інокульованих соком рослини-індикатора, доводить інфекційну природу виявленого нами захворювання ехінацеї за тріадою Коха (рис. 4).



Рис. 4. Симптоми ураження рослин ехінацеї, інокульованих соком *Chenopodium quinova* у процесі передачі інфекції за тріадою Коха (вгорі), контрольні здорові рослини (внизу)

Методом електронної мікроскопії у листках ехінацеї були виявлені паличкоподібні вірусні частки розміром 40 ± 10 нм і 100 ± 10 нм \times 17 нм із чітким каналом (рис. 5).

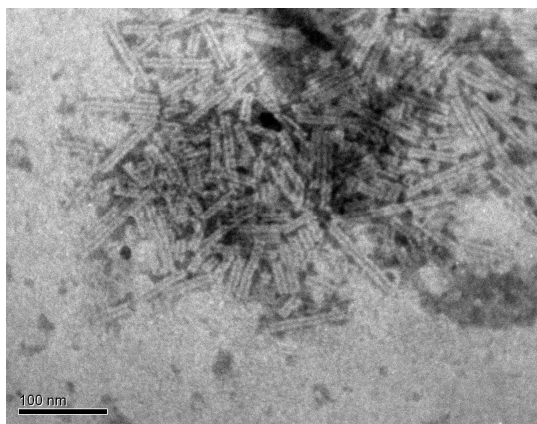


Рис. 5. Електроннограма вірусів, виявлених у листках *Echinacea purpurea* (L.) Moench, JEM-1230 з приставкою

Отже, методом біологічного тестування нами вперше була доведена інфекційна природа захворювань рослин ехінацеї за тріадою Коха. Методом електронної мікроскопії встановлена вірусна етіологія захворювання.

Під час обстежень плантацій лофанту сорту Синій велетень наявність захворювань виявлено та відібрано рослини, симптоми яких є типовими для вірусної інфекції. Захворювання проявлялося на листках усіх ярусів у вигляді дифузної хлоротичної мозаїки, яка займала майже всю листову пластинку (рис. 6, 7).



Рис. 6. Рослини лофанту сорту Синій велетень у фазу початку цвітіння із симптомами вірусної інфекції, 2012 рік



Рис.7. Фрагмент хворої рослини із симптомами мозаїки на листках лофанту

На молодих листках мозаїчні плями зливалися, внаслідок чого пластинка мала світло-жовте забарвлення. На старих листках хлоротичні

плями чергувалися із зеленими ділянками, утворюючи характерні мозаїчні візерунки. Забарвлення жилок залишалося зеленим. У рослинах з описаними симптомами були виявлені сферичні вірусні частинки діаметром 110 ± 10 нм [1, 2]. За морфологією зафіксовані нами віруси подібні до вірусів роду *Tospovirus* родини *Bunyaviridae*, що являють собою сферичні віріони різного розміру: 50, 80 і 120 нм [14]. Представники цього роду уражають широке коло одно- та дводольних рослин, тобто не мають чітко вираженої спеціалізації й передаються трипсами, чим можна пояснити їхню наявність на рослинах лофанту.

При подальшому проведенні моніторингу ураженості рослин лофанта спостерігалася ще яскравіше виражена мозаїчність, тобто симптоми ставали суворішими.

Серед досліджених нами рослин-індикаторів на інокуляцію соком хворих рослин із лофанту прореагували рослини *Datura stramonium* появою на 25-й день локальних некрозів і пожовтіння листків (рис. 8). Зазначимо, що зовні симптоми на дурмані були подібними до тих, що спостерігалися на лофанті.



Рис. 8. Пожовтіння і поява некрозів на листках рослин *Datura stramonium* після інокуляції соком хворих рослин із лофанту (ліворуч – дослід, праворуч – контроль)

Швидкозростаюча потреба вітчизняної промисловості в ефірній олії м'яти останніми роками практично повністю задовольняється за рахунок

поставок її з-за кордону, що свідчить про гостру потребу прискореного відновлення ефіроолійної галузі у нашій державі. Досягти цього можна як відновленням площ, зайнятих цією культурою, так і завдяки інтенсифікації виробництва й вдосконалення технологій її вирощування. Однак серйозною проблемою у лікарському рослинництві є вірусні інфекції. Відомо, що рослини м'яти уражуються вірусами щонайменше із 17 різних родин [13].

При обстеженні плантацій м'яти у Полтавській області виявлено рослини з симптомами хлоротичної мозаїки, зморшкуватості, дрібнолистості, деформації листкової пластинки (рис. 9).



Рис. 9. Симптоми вірусного захворювання на рослинах *Mentha piperita* L. сорту Чернолиста

Крім того, спостерігалася затримка росту інфікованих рослин. Методом електронної мікроскопії в препаратах, виготовлених із матеріалу надземної частини рослин м'яти, відзначено ниткоподібні вірусні частки розміром $520\pm 20\times 11$ нм (рис. 10). У роботі [9] у кореневищах м'яти Прилуцька 6 та Краснодарська 2 також виявлено вірусні частки різних розмірів. У коренях інфікованих рослин *Mentha piperita* сорту Чернолиста в наших дослідженнях вірусів не знайдено.

Методом ІФА (тест-система фірми LOEWE, Німеччина) нами протестовано рослинні зразки м'яти на наявність у них ХВК та інших вірусів, описаних у літературі на культурі м'яти. Результат був негативним –

антигенів X-вірусу картоплі не зафіксовано. Не виявлено також антигенів вірусів на м'яті, описаних дослідниками з інших країн (ArMV, PVY, TRV, INSV, TSWV, AMV) і вірусів, поширених в Україні (CMV, TuMV, CGMMV, PVM, PerMV, TAV).

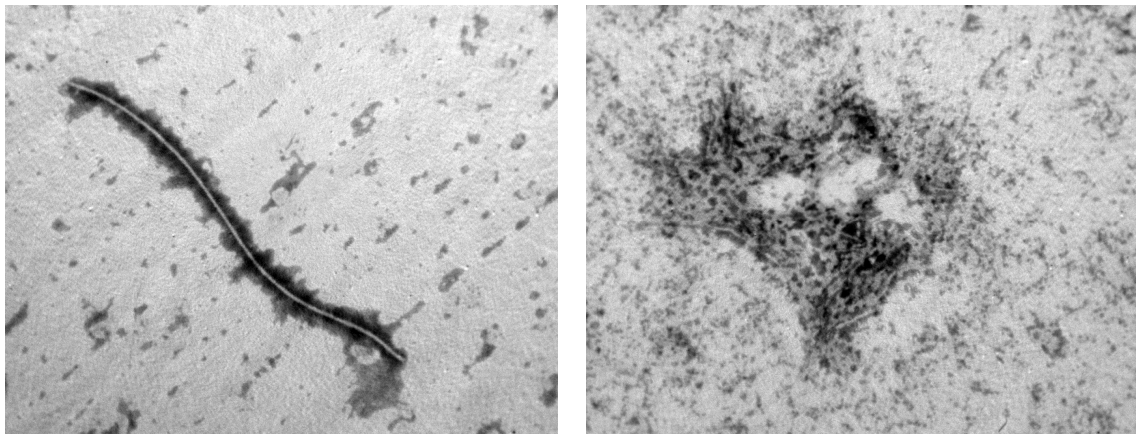


Рис. 10. Електронограма вірусів, виявлених у листках м'яти сорту Чернолиста, збільшення $\times 30\ 000$

Серед досліджених рослин-індикаторів реакцію на інокуляцію соком хворої м'яти проявили рослини санберрі (*Solanum retrofléxum*) виникненням прижилкової жовтої мозаїки на 35-й день після інфікування (рис. 11).



Рис. 11. Листок санберрі (*Solanum retrofléxum*) з симптомами вірусної інфекції (ліворуч) після інокуляції соком із хворих рослин м'яти

Цей гібрид роду пасльонових для проведення біологічного тестування вірусів лікарських рослин уперше використано нами.

У сорту м'яти Прилуцька 6, яку вирощували в АР Крим, методом ІФА виявлено ВТМ, X-, Y- віруси картоплі [9].

Таким чином, за літературними даними, протягом 1961–2011 рр. у світі описано 19 вірусів, що уражують м'яту. В Україні нині зафіксовано лише три віруси м'яти [9], два з яких (X-та Y-віруси картоплі) ніким у світі не діагностовано, включаючи й наші дослідження. Тому для запобігання поширенню вірусних хвороб лікарських рослин потрібно проводити постійний контроль ураження рослин м'яти.

Висновки

1. Проведено моніторинг і тестування вірусних інфекцій окремих лікарських рослин родини айстрових і губоцвітих у Лісостеповій зоні України.

2. Ураження вірусами лікарських рослин ехінацеї, м'яти та лофанту в польових умовах з'ясовано за результатами візуального виявлення симптомів ураження, типових для вірусних хвороб, біологічного тестування соку уражених зразків на рослинах-індикаторах вірусних інфекцій, а також виявлення паличкоподібних, ниткоподібних і сферичних віріонів методом електронної мікроскопії.

3. Інфекційна природа зафіксованого захворювання ехінацеї доведена за тріадою Коха, а вірусна етіологія – методом біологічного тестування та електронної мікроскопії.

4. Гібрид санберрі (*Solanum retrofléxum*) може бути використаний як рослина-індикатор для ідентифікації вірусного ураження рослин м'яти.

Список літератури

1. Вирусные инфекции лекарственных растений и их влияние на содержание биологически активных веществ / [Л. Т. Мищенко, А. А. Дунич, А. В. Дащенко и др.] // Вопр. биолог., мед. и фармацевт. химии. – 2013. – № 9. – С. 20–25.

2. Дуніч А. А. Вплив вірусної інфекції на елементний склад рослин лофанта анісового / А. А. Дуніч, А. В. Дащенко, Л. Т. Міщенко // Агроеколог. журн., спец. вип. – 2010. – С. 92–95.
3. Коренева А. А. Біологічні властивості вірусів лікарських рослин : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук : спец. 03.00.06 «Вірусологія» / А. А. Коренева. – К. : 2009. – 24 с.
4. Лабораторний практикум із загальної фітовірусології / [М. Д. Мельничук, В. Є. Кожухало, С. О. Смирнова, Г. Г. Мартин]. – К. : НАУ, 2002. – 260 с.
5. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навчальний посібник / М. Д. Мельничук. – К. : ПоліграфКонсалтинг, 2005. – 200 с.
6. Практикум із загальної вірусології : навч. посіб. для біол. спец. вищ. закл. освіти / [А. Л. Бойко, В. П. Поліщук, Л. В. Токарчук, Ж. А. Дулевич]; за ред. А.Л. Бойка. – К. : Київ. ун-ет, 2000. – 270 с.
7. Решетник Г. В. Діагностика вірусних інфекцій пшениці за дії абіотичних чинників : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук : спец. 03.00.06 «Вірусологія» / Г. В. Решетник. – К., 2010. – 21 с.
8. Салига Ю. Т. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів / Ю. Т. Салига, В. В. Снітинський. – Львів : Світ, 1999. – 152 с.
9. Сенчугова Н. А. Вірусні хвороби основних ефіроолійних культур Кримського регіону: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук : спец. 03.00.06 «Вірусологія» / Н. А. Сенчугова. – К., 2003. – 21 с.
10. Таранухо Ю. М. Вірусні хвороби смородини чорної і малини у лісостепу України та одержання здорового садивного матеріалу : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук : спец. 06.01.11 «Фітопатологія» / Ю. М. Таранухо. – К., 2010. – 24 с.
11. Фітосанітарний моніторинг : посібник для студ. агроном. спец. вищ. закл. аграр. освіти III-IV рівнів акредитації / [М. М. Доля, Й. Т. Покозій, Р. М. Мамчур та ін.]; за ред. М.М. Доля, Й.Т. Покозій. – К. : ННЦ ІАЕ, 2004. – 294 с.

12. Шевченко Т. П. Біологічні властивості ізолятів вірусу тютюнової мозаїки (*Tobamovirus*), виділених з різних регіонів України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня. канд. біол. наук: спец. 03.00.06 «Вірусологія» / Т.П. Шевченко. – К. : 2001. – 18 с.

13. Mint viruses: beauty, stealth, and disease / I. E Tzanetakis., J. D. Postman, A. Samad, R. R. Martin. // Plant disease. – 2010. – Vol. 94. – P. 4–12.

14. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / [eds. A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, E. J. Lefkowitz]. – Elsevier. – 2012. – 1327 p.

ТЕСТИРОВАНИЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ ИЗ СЕМЕЙСТВ ASTERACEAE И LAMIACEAE

Дашенко А.В.

*Проведены мониторинг и тестирование вирусных инфекций отдельных лекарственных растений семейств астровых и губоцветных в лесостепной зоне Украины. Методами визуальной диагностики, биологического тестирования и электронной микроскопии установлено поражение вирусами лекарственных растений эхинацеи пурпурной, мяты перечной и лофанта анисового на производственных плантациях. Инфекционная природа выявленного заболевания эхинацеи доказана триадой Коха, а вирусная этиология – методом биологического тестирования и электронной микроскопии. Установлена возможность использования гибрида санберри (*Solanum retrofléxum*) в качестве растения-индикатора вирусных болезней лекарственных растений.*

Ключевые слова: вирусные болезни, эхинацея пурпурная, лофант анисовый, мята перечная, визуальная диагностика, биологическое тестирование, электронная микроскопия

TESTING OF VIRAL INFECTIONS OF SOME MEDICINAL PLANTS OF FAMILIES ASTERACEAE AND LAMIACEAE

Dachenko A.V.

A monitoring and testing of viral infections of some medicinal plants of the family Asteraceae and Lamiaceae forest in the Ukraine. Visual methods of diagnosis, biological testing and electron microscopy demonstrated lesions viruses herbs Echinacea purpurea, Peppermint and Anise lofanta on production

plantations. Infectious disease detected by nature Echinacea proven by Koch triad and viral etiology – Biological testing and electron microscopy. We found the use of hybrid Sanberri (Solánium retrofléxum) as an indicator of plant virus diseases of medicinal plants.

Keywords: *viral diseases, echinacea purpurea, lofant anise, peppermint, biological testing, electron microscopy viral infections*