

# ВІРУСНА ПРИРОДА СКРУЧУВАННЯ ЛИСТКІВ ТОМАТІВ

Доведено, що скручування листків томатів «човник вгору» у відкритому ґрунті в Київській, Полтавській, Харківській і Кіровоградській областях спричинене М- та Y-вірусами картоплі. Вірусологічний моніторинг показав, що частота виявлення М-вірусу картоплі у рослинах томатів із симптомами скручування листків є вищою у всіх обстежених областях. Встановлено, що М- та Y-віруси картоплі суттєво знижують вміст у плодах лікопіну та β-каротину. Y-вірус картоплі спричинює найбільш суттєве зменшення концентрації як лікопіну, так і β-каротину порівняно з М-вірусом картоплі та змішаною інфекцією обох вірусів.

**фітовіруси, М-вірус картоплі, Y-вірус картоплі, томати, каротиніди, лікопін, β-каротин**

Останнім часом вірусні хвороби в умовах агроценозів набувають характеру епіфітотій, що значною мірою позначається на економічному стані сільськогосподарського виробництва. За останніми літературними даними, у рослинах томатів все частіше виявляються віруси, які передаються насінням [1]. Овочівництво закритого ґрунту дає можливість отримувати значний урожай з одиниці площі практично цілий рік, але специфічні умови теплиць (відсутність сортів і гібридів із груповою стійкістю до хвороб, особливості штучного мікроклімату в теплицях та ін.) створюють сприятливі умови для розвитку різноманітних вірусних хвороб. Вірусні хвороби спричинюють 45–80% втрат врожаю [2].

2005 року в умовах теплиць і відкритого ґрунту ми вперше виявили рослини томатів з симптомами скручування листків, які раніше не були описані для цієї культури [3]. Надалі розпочали обстеження рослин томатів як закритого, так і відкритого ґрунту на наявність симптомів скручування листків. Виявилось, що у багатьох областях України ця проблема існує. Тому *метою* нашої роботи було з'ясувати етіологію виявленої хвороби томатів.

**М.Д. МЕЛЬНИЧУК<sup>1</sup>,**  
доктор біологічних наук, академік  
НААН;

**Л.Т. МІЩЕНКО<sup>2</sup>,**  
доктор біологічних наук,

**А.А. ДУНІЧ<sup>2</sup>,**  
кандидат біологічних наук,

**І.О. АНТИПОВ<sup>1</sup>,**  
кандидат сільськогосподарських наук  
<sup>1</sup>Національний університет біоресурсів  
і природокористування України  
<sup>2</sup>Київський національний університет  
імені Тараса Шевченка

**Методи досліджень.** Зразки рослин томатів (листки, стебла та плоди) з симптомами скручування листків відбирали у господарствах відкритого і закритого ґрунту Київської, Полтавської, Харківської та Кіровоградської областей у період з березня по вересень. Застосовували загальноприйнятну методику визначення відсотка уражених рослин [4].

Морфологію вірусних часток вивчали методом трансмісійної електронної мікроскопії (ЕМ). Препарати досліджували за допомогою електронних мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та EM-125 (Суми, Україна).

Віруси ідентифікували за допомогою твердофазного імуноферментного аналізу (сендвіч-варіант) з використанням комерційних тест-систем фірми LOEWE (Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Thermo Labsystems Opsi MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. За достовірні брали значення, що перевищували негативний контроль у три рази [5].

Сумарну РНК виділяли за стандартною методикою з використанням комерційного набору РИБО-сорб-В (AmpliSens, Росія). Зворотну транскрипцію здійснювали, застосовуючи комплект реагентів Реверта-Л (AmpliSens, Росія), згідно з рекомендаціями виробника. Полі-

меразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили за допомогою ампліфікатора «GeneAmp 2400» (Applied Biosystems, США). При проведенні ПЛР використовували специфічні олігонуклеотидні праймери: PVM1 (5' taactgcagatgcctgttg 3'), PVM2 (5' tgcgatgtctttgtgcgat 3') — для ідентифікації М-вірусу картоплі, очікуваний розмір продукту ампліфікації — 276 п.н.; PVY1 (5' cggagtgttggtatgatgg 3'), PVY2 (5' tgggtgcctctctgtgttc 3') — для ідентифікації Y-вірусу картоплі, очікуваний розмір продукту ампліфікації — 365 п.н. Аналіз тотальної РНК, отриманої в результаті виділення зі зразків рослин, та аналіз продуктів ПЛР-ампліфікації проводили за допомогою електрофорезу в 1% розчині агарози з додаванням бромистого етидію в концентрації 0,5 мкг/мл, використовуючи маркер ДНК (GeneRuler™ DNA Ladder # SM 1203) [6]. Електрофорез проводили на приладі фірми «Vagos» (Литва) в режимі 15 В/см протягом 30 хв. Гелі фотографували при ультрафіолетовому випромінюванні.

Визначення β-каротину і лікопіну проводили спектрофотометрично (Mарада UV-1600, КНР) при довжинах хвиль 451 нм і 503 нм з використанням гексану [7].

Статистичний аналіз експериментальних даних виконували за параметричними критеріями нормального розподілу варіант, стандартне відхилення середніх значень — за загальноприйнятною методикою.

**Результати.** У 2005–2013 рр. обстежили рослини томатів понад 50-ти сортів (*Lycopersicon esculentum* Mill.), вирощених у відкритому і закритому ґрунті, на ураження їх вірусами. У результаті виявили такі симптоми хвороби: світло-жовта і хлоротична мозаїка; ниткоподібність листкової пластинки, бугристість, пухирчастість, зморшкуватість та сильна деформація листків (рис. 1).

Значну увагу привернули симптоми скручування листків у вигляді «човника вгору», які раніше не були описані та вивчені (рис. 2, 3).



*Рис. 1. Симптоми бугристості на листках томатів гібриду Макарена (закритий ґрунт, Київська обл., 2005 р.)*



*Рис. 2. Симптоми скручування листків томатів сорту Аврора (закритий ґрунт, Полтавська обл., 2013 р.)*



*Рис. 3. Симптоми скручування листків томатів у польових умовах сортів: а — Підмосковні ранні (2013 р.); б — Хурма (2010 р.); в — Дары Заволжья (2010 р.); г — Донбас (2013 р.)*

Саме з такими симптомами і були відібрані рослини томатів для подальших досліджень. Інфекційна природа описаних симптомів на томатах була підтверджена серією експериментальних інфікувань здорових молодих рослин томатів [8].

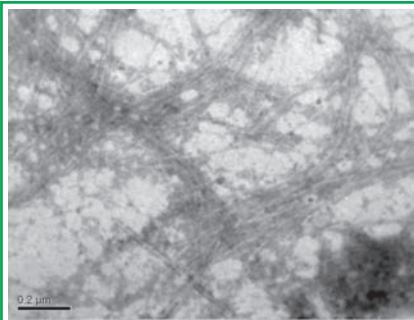
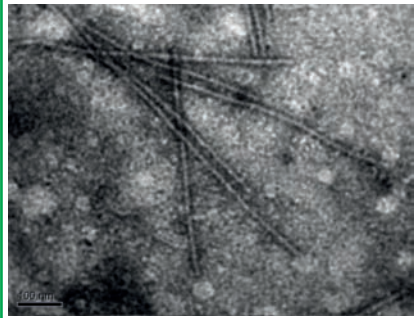
У рослинах більшості сортів з симптомами «човник вгору» виявлено ниткоподібні вірусні частки двох розмірів —  $780 \pm 20 \times 13$  нм та  $620 \pm 20 \times 13$  нм (рис. 4).

З метою ідентифікації вірусів рослини томатів із зазначеними симптомами скручування тестували на наявність вірусів, які розповсюджені на томатах у світі і які виявлені в томатах на території України та викликають симптоми, схожі до виявлених нами. Результати аналізу показали, що у рослинах томатів присутні антигени до М- та Y-вірусів картоплі (МВК та YВК). Це перше повідомлення про інфікування рослин томатів на території України Y- та M-вірусами картоплі. Аналіз також показав, що рослини з відкритого ґрунту уражені як комплексом YВК+МВК, так і моноінфекцією. На 10-ти сортах томатів детектовано змішану інфекцію (YВК+МВК): Хурма (Київська обл.), Новичек, Соляросо F<sub>1</sub>, Пародист, Любимый, W<sub>2</sub>BHW, Амурская заря, Маестро, 70В 59/07 (Полтавська обл.). МВК ідентифіковано у 13-ти сортах томатів: Хурма і Підмосковні ранні (Київська обл.), Дары Заволжья, Донбас, Фатима, Воронежский ранний, Регіони (Полтавська обл.), Ликирич, Д-29, Д-70, Д-45, Д-3 (Харківська обл.) та Деборао (Кіровоградська обл.). Із усіх протестованих сортів томатів відкритого ґрунту 5 були інфіковані YВК: Early north (Харківська обл.) і Дружба, Рання любов, Колокола, Яблунька Росії (Полтавська обл.).

Результати ІФА показали, що інші віруси, окрім МВК і YВК, які могли спричинити аналогічні симптоми та поширені на томатах у нашій країні (X-вірус картоплі, вірус тютюнової мозаїки, вірус огіркової мозаїки, вірус скручування листків картоплі, вірус аспермії томатів, вірус плямистого в'янення томатів), у рослинах відсутні.

Таким чином, вірусологічний моніторинг показав, що у рослинах томатів із симптомами скручування листків у всіх обстежених областях найчастіше виявлявся МВК (рис. 5).

Частота виявлення YВК становила 16,7–22,2% залежно від регіону


*а*

*б*

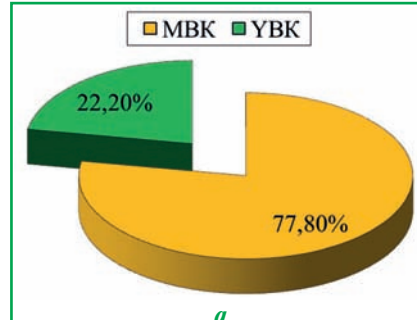
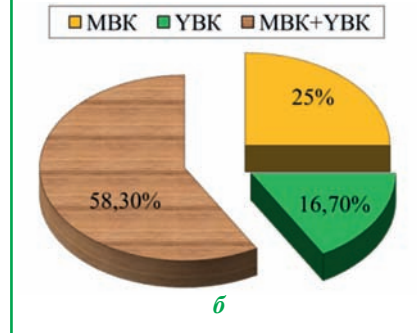
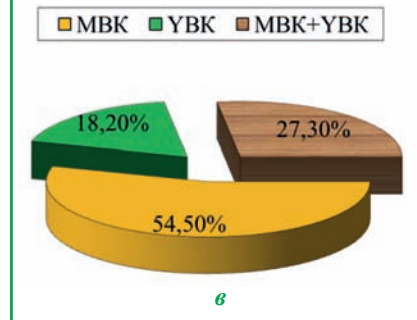
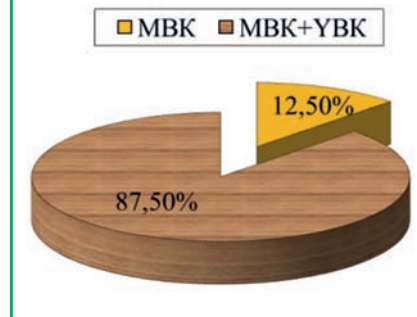
**Рис. 4.** Електронограма віріонів у рослинах томатів зі симптомами скручування листків (мікроскоп JEM-1230 з приставкою, Японія): *а* — Y-вірус картоплі, сорт Рання любов; *б* — M-вірус картоплі, сорт Воронежский ранний

виращування, а у Кіровоградській області моноінфекції YBK не виявлено. Змішану інфекцію YBK+MBK ідентифіковано в Полтавській, Київській і Кіровоградській областях (рис. 5).

Результати ІФА було підтверджено методом полімеразної ланцюгової реакції (рис. 6, 7). Аналіз результатів показав наявність продукту ампліфікації розміром 276 п.н., що відповідає кДНК до РНК M-вірусу картоплі (рис. 6) та 365 п.н. — кДНК до РНК Y-вірусу картоплі (рис. 7).

Загальновідомо, що виняткова цінність лікопіну та β-каротину томатів для організму людини полягає у потужних антиоксидантних властивостях. Вони сприяють продукції статевих гормонів, знижують ризик онкологічних, респіраторних та низки інших захворювань, β-каротин є попередником вітаміну А, завдяки чому томати широко використовуються у дієтичному харчуванні дітей та дорослих [9, 10].

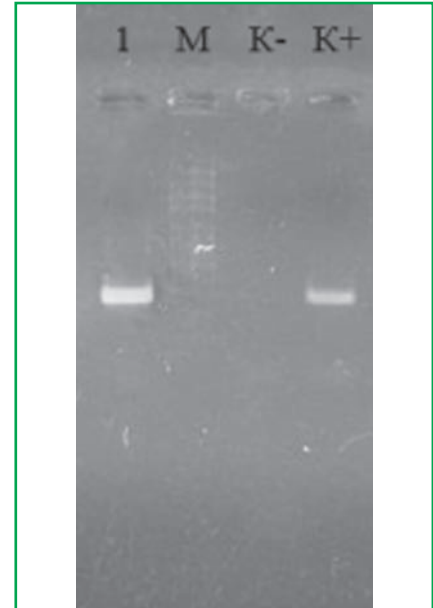
Доведено, що YBK і MBK суттєво знижують врожайність картоплі в нашій країні. Дані щодо зниження концентрації каротину і лікопіну у томатах, інфікованих деякими вірусами, наведено у роботах [11–13]. А от інформація про вплив YBK та


*а*

*б*

*в*

*г*

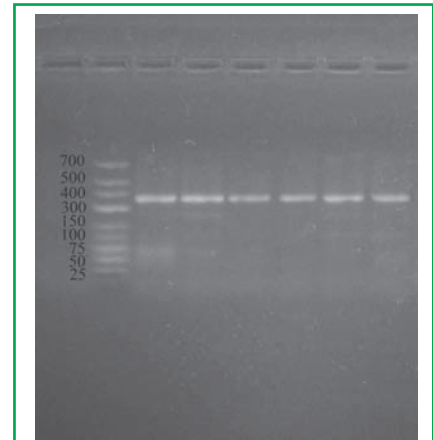
**Рис. 5.** Частота виявлення MBK та YBK у рослинах томатів зі симптомами скручування листків: *а* — Харківська обл., *б* — Полтавська обл., *в* — Київська обл., *г* — Кіровоградська обл.

MBK на якість продукції томатів в Україні відсутня. Тому наступним завданням було дослідити вплив YBK- та MBK-інфекції на кількісний вміст каротиноїдів у плодах томатів — β-каротину та лікопіну.

Нами встановлено, що M- та Y-віруси картоплі суттєво знижують у плодах вміст лікопіну та β-каротину. У плодах томатів, інфікованих YBK, концентрація лікопі-



**Рис. 6.** Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР з визначення MBK у рослинах томатів: трек 1 — томат сорту Донбас; М — маркер ДНК 100, 200, 300, 400, 500 (кб); К- — негативний контроль; К+ — позитивний контроль (276 п.н.)



К- М К+ 4 5 6 7 8

**Рис. 7.** Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР визначення YBK у рослинах томатів, треки: К- — негативний контроль; М — маркер ДНК 25, 50, 75, 100, 150, 300, 400, 500, 700 (кб); К+ — позитивний контроль (365 п.н.); 4 — сорт Early north; 5 — сорт Дружба; 6 — сорт Рання любов; 7 — сорт Колокола; 8 — сорт Яблунька Росії

ну менша порівняно з контрольними зразками у 2,3–3,5 рази, MBK — у 1,3–2,1 рази, YBK+MBK — 1,5–2 рази залежно від сорту рослин. Вміст β-каротину за дії YBK-інфекції був меншим у 1,4–1,9 рази, MBK — у 1,1–1,3 рази, MBK+YBK — у 1,2–1,4 рази порівняно зі здоровими рослинами [14].



Слід зазначити, що УВК зумовлює найбільше зменшення концентрації як лікопіну, так і каротину порівняно з моноінфекцією МВК та змішаною інфекцією обох вірусів, що свідчить про його високу шкодоцинність для продукції томатів.

#### ВИСНОВКИ

Нами встановлено, що хвороба рослин томатів, яка проявляється скручуванням листків, має вірусну етіологію (природу), що було доведено трьома сучасними методами досліджень у фітовірусології. У ході роботи встановлено таксономічне положення виявлених вірусів — це М- та Y-віруси картоплі. Аналіз одержаних результатів показав, що у всіх обстежених областях МВК детектувався частіше, ніж УВК. Крім того, великий відсоток протестованих рослин томатів мали змішану інфекцію обох вірусів, особливо це характерно для Кіровоградської (87,5% рослин зі симптомами скручування) та Полтавської (58,3%) областей.

Необхідно зазначити, що дослідження виявили шкідливий вплив вірусів на рослини. На плодах наприкінці вегетації вірусна хвороба проявляється у вигляді некротичних плям з подальшим швидким гниттям, що псує товарний вигляд продукції та термін її зберігання. Встановлено, що за дії М- та Y-вірусів картоплі відбувається суттєве зниження кількісного вмісту каротиноїдів лікопіну та β-каротину у плодах томатів.

Одержані нами результати вказують на необхідність профілактики і захисту рослин томатів від виявлених патогенів. Зважаючи на те, що основними шляхами передачі МВК і УВК є векторний (попелиці), ме-

ханічний, контактний, насіннєвий та шепленням, особливу увагу слід приділяти контролю переносників (інсектицидами, препаратами на основі ентомопатогенних грибів чи бактерій, хижими і паразитичними комахами), знезараженню насіння (термічне, хімічне — з використанням 1% розчину перманганату калію) та інвентарю, виконувати комплекс агротехнічних заходів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Насіннева вірусна інфекція рослин родини *Solanaceae* / Цвігун В.О., Шамрайчук В.О., Руднева Т.О. та ін. // Агроекологічний журнал. — 2012. — № 3. — С. 131 — 133.
2. Нгуен Ха Тхи Куинь Чанг Распространение и патогенез вирусных заболеваний томата в условиях Вьетнама и России // Автореф. дис. канд. биол. наук, спец. 06.01.07 — защита растений, Москва, 2013. — 22 с.
3. Міщенко Л.Т. Виявлення вірусів на томатах за умов відкритого і закритого ґрунту / Л.Т. Міщенко, А.В. Чигирин, Г.С. Янішевська // Таврійський науковий вісник. — 2010. — Вип. 71, Ч. 3. — С. 45—50.
4. Пересипкін В.Ф. Практикум із основ наукових досліджень у захисті рослин / В.Ф. Пересипкін, І.Л. Марков, В.С. Шелестова. — К., 2000. — 164 с.
5. Clark M.F. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / Clark M.F., Adams A.N. // J. Gen. Virology. — 1977. — Vol. 34. — P. 574—586.
6. Мельничук М.Д. Молекулярна діагностика та ідентифікація X-, Y-, M-, S-, L-вірусів картоплі (*Solanum tuberosum* L.) методом полімеразної ланцюгової реакції (Методичні рекомендації) / Мельничук М.Д., Антипов І.О., Спиридонов В.Г. — К., Видавничий центр НАУ: 2008. — 22 с.
7. Методы биохимического исследования растений / под ред. Ермакова. — Л. — 1987. — С. 106—107.
8. Властивості томатних ізолятів М- та Y-вірусів картоплі / Міщенко Л.Т., Дуніч А.А., Данілова О.І., Поліщук В.П. // Мікробіологічний журнал. — 2013. — Т. 75, № 2. — С. 89—97.
9. Sahin K. Lycopene in Cancer Prevention / Sahin K., Kucuk O. // In: Natural Products. —

2013 [eds. Ramawat K.G., Merillon J. M.]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — P. 3875—3922.

10. Yang K. Lycopene: Its Properties and Relationship to Human Health / Yang K., Lule U., Xiao-Lin D. // Food Rev. International. — 2006. — Vol. 22. — P. 309—333.

11. Altered Metabolism of Tomato Leaves due to Cucumber Virus (CMV) / Akanda A.M. et al. // Bangladesh Journal of Scientific Research. — 1998. — Vol. 16 (1). — P. 1—6.

12. Biochemical Changes of Tomato due to Purple Vein Virus / Alam M. et al. // Bangladesh Journal Biol. — 1996. — Vol. 25. — P. 25—30.

13. Change of Pigment Contents of Virus Infected Tomato Plant / Raitthak P.V., Gachande B.D. // Asian Journal of Biol. & Biotechnol. — 2012. — Vol. 1(1). — P. 1—4.

14. Міщенко Л.Т. Вплив фітовірусів на якість продукції томатів / Міщенко Л.Т., Дуніч А.А., Данілова О.І. // 36. «Виробництво екологічно безпечної сільськогосподарської продукції: проблеми та перспективи». 10—11 жовтня 2013 р., Ніжин. — Ніжин, 2014. — С. 3—7.

Мельничук М.Д., Міщенко Л.Т., Дуніч А.А., Антипов І.О.

#### Вирусная природа скручивания листьев томатов

Доказано, что скручивание листьев томатов «лодочка вверх» в открытом грунте Киевской, Полтавской, Харьковской и Кировоградской областей вызвано M- и Y-вирусами картофеля. Вирусологический мониторинг показал, что частота выявления M-вируса картофеля в растениях томатов с симптомами скручивания листьев является выше во всех обследованных областях. Установлено, что M- и Y-вирусы картофеля существенно снижают содержание в плодах ликопина и β-каротина. УВК вызывает наиболее значительное уменьшение концентрации указанных каротиноидов в сравнении с M-вирусом картофеля и смешанной инфекцией обоих вирусов.

фітовіруси, M-вірус картоплі, Y-вірус картоплі, томат, каротиноїди, лікопін, β-каротин

Melnichuk M.D., Mishchenko L.T., Dunich A.A., Antipov I.O.

#### Finding out of the nature of tomatoes leaf roll

It was proved that upward leaf roll of tomatoes in the fields of Kyiv, Poltava, Kharkiv and Kirovograd regions is caused with Potato virus M and Potato virus Y. Viral monitoring is showed that frequency of exposure of Potato virus M in tomatoes with leaf curl symptoms is higher in the all of observed areas. It was investigated that Potato virus M and Potato virus Y significantly decrease content of lycopene and β-carotene in tomatoes fruits. PVY causes the most substantial decreasing of the carotenoids concentration than PVM and than mixed infection of both viruses.

plant viruses, Potato virus M, Potato virus Y, tomatoes, carotenoids, lycopene, β-carotene

Рецензент:

Шербанко І.С., доктор біологічних наук, професор Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН