

Ізоляти тешовірусів свиней, виділені від синантропних тварин, спричиняють захворювання поросят з клінічними ознаками та летальністю, характерними для класичної форми ензоотичного енцефаломієліту (хвороби Тешена) свиней.

Контамінація тешовірусами продукції свинарства, різних об'єктів тваринницьких приміщень посилює розповсюдження збудників у навколишньому природному середовищі, особливо за недотримання ветеринарно-санітарних норм.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Derbyshire J.B.* Enterovirus / J.B. Derbyshire // *Diseases of Swine*. — Iowa: Iowa state University Press. — 1999. — P. 145–150.
2. *Романенко В.Ф.* Етіологія ентеровірусного гастроентерита свиней / В.Ф. Романенко, Е.И. Полевик // *Ветеринария*. — 1992. — № 3. — С. 29–30.
3. *Этиология энзоотической пневмонии свиней* / В.Ф. Романенко, А.А. Бокун, Н.В. Бабич и др. // *Ветеринария*. — 1988. — № 2. — С. 35–37.
4. *Романенко В.П.* Ентеровіруси і їх патогенні властивості для свиней / В.П. Романенко // *Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології*. — 1997. — № 1. — С. 34–35.
5. *Virus Taxonomy: 2012 Release (current)* [Електронний ресурс] / Офіційний сайт Міжнародного комітету з таксономії вірусів. — Режим доступу: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
6. Пат. 58734 Україна, МПК G01N 33/53 (2006.01) / Т.О. Бова, І.В. Волкова, С.В. Дерев'яно. — № u201011151; заявл. 17.09.2010; опубл. 26.04.2011, Бюл. № 8.
7. *Bogel K.* Untersuchungen über die Chloroform-resistenz der Enteroviren des Rindes und des Schweines / K. Bogel, A. Maer // *Zbl. Vet. Med.* — 1961. — В. 8. — No. 9. — S. 908–922.

УДК 578.863/578.866/582.572.2

## ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ ХОСТ В УКРАИНЕ

А.Н. Кириченко, А.Г. Коваленко

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины*

*Вірус хости Х стає серйозною проблемою в декоративному квітництві як збудник захворювань комерційно важливих рослин хости в усьому світі. Висвітлено проблеми масового інфікування рослин вірусом, зумовлених високою ймовірністю їх ураження шляхом механічної інюкуляції, що ускладнюються через тривалу безсимптомну персистенцію вірусу в рослинах (упродовж декількох тижнів, місяців або років після інфікування) і складністю ранньої діагностики. Представлено результати дослідження (діагностики захворювань) рослин хости з вірусоподібними симптомами на листках із приватних колекцій Київської області. Було встановлено, що симптоми захворювання спричиняються щонайменше двома різними вірусами — Hosta Virus X (HVX) і Tobacco Rattle Virus (TRV).*

**Ключові слова:** *діагностика, хости, віруси рослин, Hosta Virus X, Tobacco Rattle Virus.*

Хосты имеют хорошую репутацию среди садоводов благодаря своей декоративности, долговечности, неспособности поражаться болезнями и устойчивости к основным вредителям. В последнее время ситуация с хостами изменилась: из-под контроля вышли не только распростра-

нение листовых нематод, но и развитие болезней растений, в основном из-за активизации мирового рынка хосты. И раньше случалось, что хосты заражались вирусами *Tomato Ringspot Virus*, *Impatiens Necrotic Spot Virus*, *Tobacco Rattle Virus* и *Cucumber Mosaic Virus* от других растений, но это не принимало масштабов эпифитотий и не имело постоянного характера.

© А.Н. Кириченко, А.Г. Коваленко, 2014

Впервые неописанный ранее на хостах вирус был обнаружен в 1996 г. в штате Миннесота, США [1]. Выявленный вирус был отнесён к роду *Potexvirus* и назван вирусом хосты X (ХВХ) (*Hosta Virus X*). Впоследствии ХВХ был обнаружен в Корее, Нидерландах, Польше, Франции и Новой Зеландии [2]. В Украине впервые ХВХ на хостах был обнаружен в 2012 г. [3]. Данные филогенетического анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов транспортного и капсидного белков всех известных изолятов ХВХ показали высокую степень их генетического родства и подтвердили предположение, что вирус хосты X является самостоятельным видом рода *Potexvirus* [4]. Частицы ХВХ имеют модалную длину 530 нм, плавучую плотность в хлористом цезии — 1,28 г/см<sup>3</sup> и содержат ssRNA. Молекулярный вес капсидного белка составляет 27 кДа. Результаты анализа 3'-конца ХВХ показали, что вирус является типичным представителем *Potexviridae*. 3'-конец ХВХ состоит из 2711 нуклеотидов и включает последовательности, кодирующие вирусную репликазу, тройной блок генов TGB1 (26 кДа), TGB2 (13 кДа), TGB3 (8 кДа) и белок оболочки (CP, 23 кДа), а также 3'-нетранслируемую область NTR. Геномная РНК вируса имеет 50% нуклеотидов, идентичных другим секвенированным потексвирусам. Это является молекулярным доказательством, подтверждающим, что ХВХ — это отдельный вид рода *Potexvirus* [4].

Одним из наиболее интересных результатов было то, что инфекционность вируса зависит от стадии развития растений и не зависит от его концентрации в растительном материале [5]. Вирус механически легко передаётся весной до цветения и в период активного вегетативного роста и практически не передаётся после цветения растений или в состоянии покоя. Все известные сегодня изоляты вируса легко инфицируют растения механически. Исследователи полагают, что не существует устойчивых сортов хост, хотя вирусы могут и не вызывать у растений видимых симптомов в течение трех и более лет после за-

ражения. Изучение способов распространения ХВХ всё ещё не завершено, однако есть все основания предположить, что он не может распространяться насекомыми, грибами, нематодами или пылью.

В настоящее время ХВХ является одним из самых опасных вирусов, вызывающих вирусные эпидемии на декоративных культурах. Так как хосты — многолетники, с каждым годом увеличивается степень инфицирования растений, возрастает вероятность заражения здоровых растений хосты, а также других культур вследствие возможных мутаций вирусного генома. Глобализация торговли декоративными растениями увеличила риск более широкого распространения вируса [6].

Характер симптомов и степень их проявления на растениях, инфицированных ХВХ, в значительной мере зависят от сорта и состояния растений, погодных условий. Часто хосты заражаются несколькими вирусами одновременно, что значительно усложняет диагностику болезней.

Вирус погремковости табака (ВПТ) вызывает у растений хосты мозаику, крапчатость, хлоротическую пятнистость и локальные некрозы на листьях. Этот вирус широко распространён в природе и имеет значительный круг поражаемых им растений. Растения, пораженные в раннем возрасте, как правило, имеют деформированные стебли и листья. Вирус распространяется главным образом нематодами, которые питаются корнями зараженных растений и передают вирус при последующем питании на здоровых растениях. ВПТ также может распространяться механически через загрязнённые инструменты при обрезке кустов или черенковании. Этот вирус иногда обнаруживается в семенах зараженных растений.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе были исследованы образцы листьев *Hosta lanceolata* и *Hosta plantaginea* с признаками вирусного поражения, отобранные из частных коллекций садовых растений в Обуховском районе (с. Плю-

ты), визуально, а также методами растений-индикаторов и электронной микроскопии.

Для исследования образцов были использованы следующие растения-индикаторы: *Chenopodium amaranticolor* L., *Ch. quinoa* Willd., *Ch. album* L., *Cucumis sativus* L., *Vigna unguiculata* L., *Beta vulgaris* L., *Solanum tuberosum* L., *Nicotiana rustica* L., *N. tabacum* L., *N. glutinosa* L., *Phaseolus vulgaris* L., *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Zinnia elegans* Jacq., *Hosta lancifolia*, *H. sieboldiana*.

Механическую передачу вирусов осуществляли в соответствии с общепринятой методикой [7] путем втирания инокулюма в поверхность листьев растений-индикаторов, предварительно опудренных карборундом. Листья контрольных растений соответственно обрабатывали буфером.

Электронно-микроскопические исследования растительных экстрактов проводили в электронном микроскопе JEM 1400 при инструментальном увеличении 20000–50000 [8]. Препараты контрастировали 1%-ным водным раствором уранил ацетата или 2%-ным раствором фосфорновольфрамовой кислоты (Ph 7,2).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

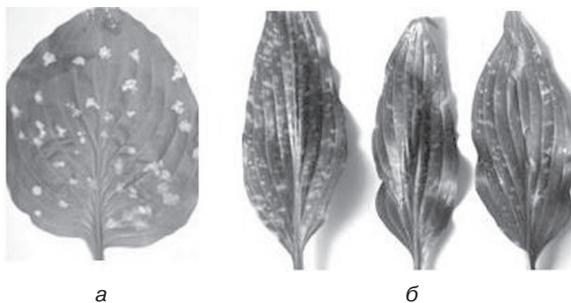
Вирус хосты Х вызывает целый ряд симптомов, спектр которых варьирует от задержки роста, энаций, сморщивания, скручивания и разного рода пятнистостей листовой пластинки до некроза и отмирания части или всего растения. Из-

менения в пигментации (посветление — потемнение) часто сменяются общей мозаикой и крапчатостью, округлые пятна или симптомы типа ink-bleed («расплывание чернил») локализованы главным образом вдоль жилок листа. Очень часто симптомы инфицированного ХВХ растения трудно отличить от физиологических изменений в растениях. Они могут не проявляться в течение нескольких лет, а у некоторых восприимчивых к ХВХ сортов и вовсе не обнаруживаются [9]. В целом внешнее проявление вирусной инфекции характерно для каждого сорта хосты, и от сорта к сорту может варьировать.

Отобранные нами образцы хосты были исследованы визуально. Чаще всего на зараженных растениях хосты выявляли пятнистость листовой ткани, локализованной в основном вдоль жилок листа. Этот тип симптомов, обнаруженных на хостах при инфицировании ХВХ, может быть вызван и другими вирусами, но не является результатом мутаций здоровых растений, а указывает на вирусное поражение растений. Наиболее часто в качестве раннего симптома инфицированных ХВХ растений обнаруживали появление изменений окраски ткани вдоль жилок листа. Предполагается, что вирус может распространяться из жилок в паренхимную ткань листьев, вызывая при этом изменение цвета здоровых тканей. Для более тяжелой инфекции характерно сплющивание листовой пластинки, «обезвоживание» и «обесцвечивание» ткани.

На листьях хосты, собранных в окрестностях Киева, были обнаружены также симптомы в виде неравномерных желтых пятен, колец, полос, мозаичности, прозрачных штрихов и точек при рассматривании листа на просвет. Вдоль жилок наблюдались коричневые пятна некротизированной ткани, листья немного скрученные, деформированные, хлоротичные (рис. 1).

Однако эти изменения ещё не дают оснований делать выводы о наличии вирусов в образцах. Они могут быть



**Рис. 1.** Симптомы вирусного поражения на листьях *Hosta plantaginea* (а) и *Hosta lanceolata* (б)

Реакции растений на инфицирование вирусом

| Вид растения  | Симптомы   |
|---|--|
| <i>Beta vulgaris</i> L.   | Хлоротичные и некротические поражения; системная крапчатость листьев                       |
| <i>Chenopodium amaranticolor</i> L.<br><i>Ch. quinoa</i> Willd. | Локальные некрозы, системная реакция отсутствует   |
| <i>Nicotiana tabaccum</i> L.<br><i>N. rustica</i> L.            | Некротические локальные поражения, некротическая кольцевая пятнистость; системная инфекция |
| <i>Nicotiana glutinosa</i> L.                                   | Некротические локальные поражения; системная мозаика                                       |
| <i>Datura stramonium</i> L.                                     | Мелкие некрозы на инокулированных листьях  |
| <i>Cucumis sativus</i> L.                                       | Локальные некрозы на инокулированных листьях, системная реакция отсутствует                |
| <i>Gomphrena globosa</i> L.                                     | Мелкие некротические или хлоротичные некрозы на инокулированных листьях                    |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> L.                                    | Жёлтая пятнистость на инокулированных листьях, отсутствует системная инфекция              |
| <i>Vigna unguiculata</i> L.                                     | Без симптомов  |
| <i>Zinnia elegance</i> Jacq.                                    | Хлоротичные локальные некрозы  |
| <i>Solanum tuberosum</i> L.                                     | Мелкие коричневые некрозы  |

Примечание: \* при механической инокуляции растений в условиях теплицы.

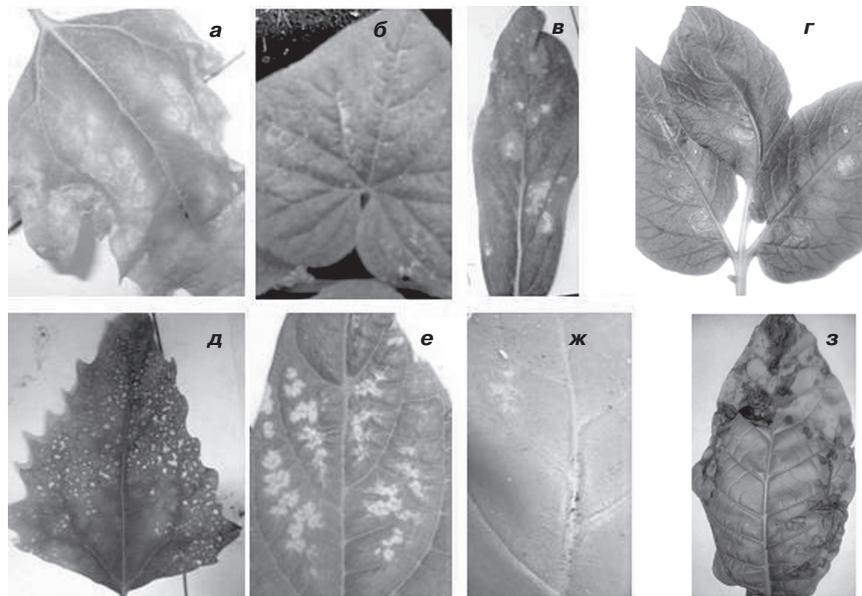
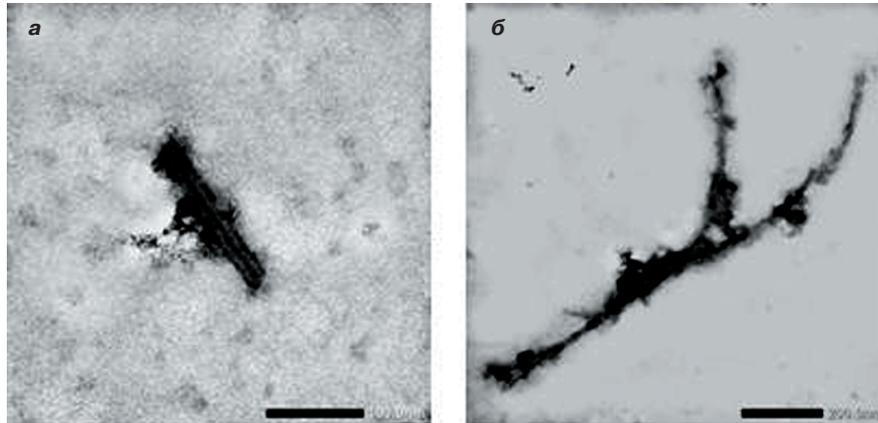


Рис. 2. Реакция некоторых растений на механическую инокуляцию инфекционным соком: *Chenopodium album* L. (а), *Cucumis sativus* L. (б), *Gomphrena globosa* L. (в), *Solanum tuberosum* L. (г), *Ch. amaranticolor* L. (д), *Phaseolis vulgaris* L. (е), *Nicotiana rustica* L. (ж, з)



**Рис. 3.** Электронограммы вирусных частиц в препаратах, полученных методом погружения: а) *Tobacco Rattle Virus*, б) *Hosta Virus X*

вызваны другими возбудителями, физиологическими процессами при нарушении условий содержания растений, поэтому было проведено биологическое тестирование поражённых листовых тканей.

Метод растений-индикаторов (биологическое тестирование) основан на способности некоторых видов растений реагировать на заражение тем или иным вирусом специфическими видимыми симптомами.

Использование этого метода для диагностики ХВХ связано с трудностями, так как по литературным данным [1] вирус не инфицирует другие виды растений и часто может не вызывать видимых симптомов на растениях хост в течение нескольких лет (латентное вирусоносительство). Единственным экспериментальным растением, реагирующим на инфицирование вирусом системной мозаикой, представляется *Nicotiana benthamiana* [1].

Результаты, полученные при исследовании реакций различных растений-индикаторов на механическую инокуляцию соком больных растений, представлены в таблице.

При микроскопировании образцов в препаратах, контрастированных 2% раствором уранил ацетата, были выявлены (рис. 3) вирусные частицы с различной модальной длиной и морфологией:

а) прямые, палочковидные вирионы с модальной длиной 50–114 или 180–200 нм и диаметром 22 нм. Просматривается осевой канал 4 нм в диаметре;

б) нитевидные (500–600 нм) вирионы без осевого канала, с тенденцией к агрегированию «бок о бок» и/или «из конца в конец».

По морфологии вирионов и размеру наблюдаемые вирусные частицы с модальной длиной 500–600 нм и 50–114 (180–200) нм соответствует ХВХ [10] и ВПТ.

Таким образом, по результатам визуального наблюдения, биологического тестирования и электронной микроскопии в исследованных образцах были идентифицированы, по крайней мере, 2 вируса — *Hosta Virus X* и *Tobacco Rattle Virus*.

### ВЫВОДЫ

При работе с хостами необходимо учитывать, что зараженный растительный материал сохраняет инфекционность в течение более девяти недель при температуре +4°C. Свежий растительный материал всегда инфекционный. Почва с ХВХ-зараженными растительными остатками и корневым материалом может быть источником вирусной инфекции в течение более двух лет. Вирус из зараженного растения легко передается механически

через загрязненные инструменты и руки при обрезании листьев и делении корневищ [5].

Гораздо сложнее контролировать ВПТ, распространяющийся, главным образом, нематодами, чем *Hosta virus X*. Посредством нематод вирус может передаваться от растения к растению. Химические вещества, уничтожающие нематоды, являются высокотоксичными и засоряют почву. Визуальные наблюдения и профилактика — это лучший способ контролирования декоративных насаждений от болезней.

Для предотвращения инфицирования и распространения вирусных заболеваний на хостах необходимо соблюдать следующие правила:

1. Регулярный контроль распространения болезней.

2. Зараженные растения должны быть уничтожены, не рекомендуется использовать их на компост, чтобы свести к минимуму заражения других восприимчивых растений.

3. Остаточные ткани корней являются источником инфекций и могут заразить вновь высаженные восприимчивые растения хосты, поэтому не рекомендуется производить посадку растений на том же месте, пока вирус полностью не деградирует под воздействием микроорганизмов.

4. Пересадка и вегетативное размножение, расчистка растений в конце года должны производиться только после удаления растений с симптомами болезни.

5. Почву из горшков с инфицированными растениями не следует вторично использовать без предварительной дезинфекции хлорной известью (1:10) или другого средства, предназначенного для этой цели.

6. Садовые инструменты следует дезинфицировать, прежде чем производить деление кустов хосты, обрезание корней, цветоносов и т.п.

7. Дезинфицировать инвентарь нужно перед уходом за каждым растением или, как минимум, за каждым сортом, так как некоторые сорта являются бессимптом-

ными носителями болезни и могут быть источником инфекции.

8. Использовать следующие обеззараживающие средства для инструментов: высокую температуру (прокаливание на огне или ополаскивание в кипящей воде), 10% отбеливатель или 3% формальдегид («Формалин»), раствор хаотропных агентов (6М мочевины, 4М тиоцианат гуанидина).

Необходимо соблюдать элементарные меры профилактики — тщательно мыть руки до и после работы с каждым растением. Один из способов остановить вирусную эпифитотию — обучиться распознавать инфекцию и выбраковывать зараженные растения в процессе ухода за ними.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Currier S. Characterization of a Potexvirus Infecting *Hosta* spp. / [S. Currier, B. Lockhart] // Plant Disease. — 1996. — Vol. 80. — P. 1040–1043.
2. Presence of *Hosta virus X* in New Zealand / [J. Tang, C. Hardy, B. Lebas, L. Ward] // Australasian Plant Dis. Notes. — 2012. — No. 7. — P. 39–40.
3. First detection of *Hosta Virus X* in Ukraine / [G. Shchetinina, I. Budzanivska, A. Kharina, O. Pereboychuk] // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. — 2012. — Вип. 62. — С. 48–50.
4. Biological and molecular characterization of a U.S. isolate of *Hosta virus X* / [C. Torre, F. Qu, M. Redinbaugh, D. Lewandowski] // Phytopathology. — 2012. — Vol. 102, No. 12. — P. 1176–1181.
5. Midwest regional hosta society newsletter — Apollo Hosting [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://midwesthosta-society.org>
6. First report of hosta virus X infecting hosta plants in China / [M.S. Wei, Y. J Zhang, G.F. Li, J. Ma] // Plant disease. — 2013. — Vol. 97, № 3. — P. 429.
7. Основы вирусологии растений / Пер. с англ. под ред. И.Г. Атабекова. — М.: Мир, 1978. — 429 с.
8. Doane F.W. Electron microscopy in diagnostic virology, a guide and atlas / [F.W. Doane, N. Anderson]. — Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1987. — 182 p.
9. Blanchette B. *Hosta virus X*: A three-year study / [B. Blanchette, B. Lockhart] // Hosta Journal. — 2003. — Vol. 35, No. 3. — P. 19–23.
10. The new plant virus family Flexiviridae and assessment of molecular criteria for species demarcation / [M.J. Adams, J.F. Antoniw, M. Bar-Joseph et al.] // Arch. Virol. — 2004. — Vol. 149, No. 5. — P. 1045–1060.