

## СКРИНІНГ ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ ВТМ (*TOBAMOVIRUS*) НА РОСЛИНАХ ПЛАТАНА СХІДНОГО (*PLATANUS ORIENTALIS* L.) ТА КЛЕНА ГОСТРОЛИСТОГО (*ACER PLATANOIDES* L.)

А.В. Орловський, В.В. Мороз, А.Л. Бойко

*Інститут агроєкології і природокористування НААН*

*Проведено оригінальні дослідження вірусної інфекції деревних рослин лісових біоценозів України. Вибір зразків платана східного (*Platanus orientalis* L.) та клена гостролистого (*Acer platanoides* L.) здійснювали в лісах, парках, а також скверах у зоні Українського Полісся (Житомирська, Київська області). У роботі використано: візуальні дослідження, електронну мікроскопію, імуноферментний аналіз, метод внутрішньокліткових включень, рослини-індикатори, комп'ютерний супровід (мікроскоп — об'єкт — монітор). Встановлено, що на платані східному ізолят вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) переважно спричиняє некротичну реакцію (некрози). На клені гостролистому ВТМ індукує симптоми своєрідної мозаїки, що впродовж липня — серпня трансформується в хлороз. Спостерігається скручування та відмирання листя, його передчасне опадання, а також некрози, пошкодження деревини. Встановлено, що ідентифікований ізолят ВТМ (*Tobamovirus*) має деяку серологічну подібність з ізолятами вірусу таксономічної групи, які уражають томати, тютюн, соняшник, а також такі лікарські рослини, як подорожник та хміль.*

**Ключові слова:** вірус, біоценоз, лісові насадження, платан східний, клен гостролистий, рослини-індикатори, лікарські рослини.

Лісові насадження є необхідною компонентою екосистеми навколишнього природного середовища і в аспекті людських потреб розглядаються як додаткове джерело для різних галузей господарювання.

В Україні ліси поширюються в різних природно-кліматичних зонах — Лісостепі, Українському Поліссі, Степу, Українських Карпатах та гірському Криму, які мають відмінності щодо біорізноманіття та сучасного ведення лісового господарства.

Нині стан лісів в умовах різкої зміни абіотичних і біотичних чинників, а саме: інтенсивного природокористування, посиленого антропогенного впливу на навколишнє природне середовище, кліматичних катаклізмів, розбалансування екосистеми характеризується як кризовий.

Слід зауважити, що такі чинники, як радіаційне навантаження [1, 2], різка зміна клімату, порушення гідрологічного режиму, безгосподарна діяльність людини, індуку-

ють мінливість і появу нових патогенів, що є небезпечними для деревних і трав'яних рослин, грибів і біоти загалом. До таких патогенів відносяться і вірусні хвороби [3–6].

Мета роботи — проведення скринінгу вірусних хвороб платана східного і клена гостролистого у лісових, а також паркових ценозах, скверах, алеях, агроценозах і в сільських селітебних територіях у зоні Українського Полісся (Житомирська, Київська області).

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі були задіяні методи, які використовуються для аналізу рослин та ідентифікації вірусів [7–12].

Під час обстеження ділянок у лісових і паркових насадженнях здійснювали відбір зразків рослин, у яких спостерігались такі симптоми: гофрування і деформація листків, різні типи мозаїки і некрози листової поверхні, відставання у рості рослин, а також рослин без перелічених проявів

захворювання. З деякими екземплярами клена і платана [8] проводили дослідження щодо динаміки розвитку вказаних симптомів: весна — початок вегетації спостереження перших симптомів захворювання; літо — розвиток рослини і її реакція на захворювання; осінь — визначення наявності вірусних симптомів аж до повного їх зникнення після пожовтіння і опадання листя. Увесь період (весна — осінь) рослини клена і платана контролювали за допомогою вірусологічних тестів.

Біологічними індикаторами для вірусів слугували різні види рослин (дурман, тютюн різних сортів, лобода, квасоля, огірки та такі лікарські види рослин, як подорожник і хміль). Рослини-індикатори вирощували ізолювано в лабораторних теплицях на стерильному ґрунті. Роботи з рослинами-індикаторами проводили при температурі повітря 20–25°C і освітленості 8–10 тис. лк [12].

Рослини-індикатори інокулювали механічно інфекційними гомогенатами рослинного матеріалу в розведенні 1:1 або 1:2 у 0,01 М фосфатному буфері, рН 7,0–7,5. Для прискорення отримання результатів (3–4 дні) і накопичення вірусів використовували рослини-індикатори, які реагували локальною реакцією. Якщо рослини-індикатори з місцевою реакцією не були відомі, використовували рослини з системною реакцією, яка розвивалася на 7–10 день після інокулювання.

Для визначення антигенів вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) у досліджуваних зразках рослин використовували непрямий імуноферментний метод (ІФА) [12]. Зразки, що підлягали аналізу, гомогенізували у ступці з 0,1 М фосфатно-сольовим буфером, рН 7,4, з додаванням 0,05 М карбонат-бікарбонатного буферу, рН 9,6, у співвідношенні 1:2 v/v. Також використовували поліклональні кролячі антивірусні сироватки до вірусів (Інститут досліджень стійкості та діагностики патогенів, Асершлебен, Німеччина; Київський національний університет імені Тараса Шевченка).

Результати реєстрували на автоматичному рідері (OPS IS MR) при довжині хви-

лі 405 нм. За позитивний результат брали показник  $E_{405}$ , що втричі перевищував показник негативного контролю. Статистичну достовірність результатів аналізу підтверджували триразовою повторністю.

Для дослідження вірусних частинок у соку уражених рослин препарат готували у такий спосіб: відібрані рослини гомогенізували в 0,1 М фосфатному буферному розчині (ФБР), рН 7,4 і попередньо центрифугували при 5 тис. обертів/хв упродовж 15 хв. Надосадову суспензію використовували для нанесення на сіточки-підкладки [7, 12].

Плівки-підкладки готували з 0,2% розчину формвару (полівінілформальдегід) на хлороформі.

Сіточку з формваровою підкладкою занурювали на 2 хв у краплю вірусного препарату, потім виймали, відбирали залишки рідини стерильним фільтрувальним папером і занурювали в 2%-ий розчин ураніл-ацетату або 1–2%-ий розчин фосфорновольфрамової кислоти на 2 хв, після чого відбирали рідину фільтрувальним папером і поміщали сітку в спеціальний контейнер.

Препарати досліджували на трансмісійному електронному мікроскопі JEM 1400 (Японія) при інструментальному збільшенні у 20000–40000 разів з наступним перенесенням досліджуваного об'єкта на монітор комп'ютера. (Аналіз проведено на базі Інституту мікробіології і вірусології імені акад. Д.К. Заболотного НАН України).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одним із чинників багатьох захворювань деревних рослин є їх ураження вірусними патогенами. У сучасній літературі рідко трапляються результати з виявлення вірусів у лісових екосистемах порівняно з вивченням хвороб вірусного походження в агроценозах. Разом з тим останнім часом віруси були ідентифіковані на листопадних плодкових рослинах і деяких широколистяних і хвойних деревах [4–7].

Вірусоподібні симптоми часто залишаються неідентифікованими. Спричинено

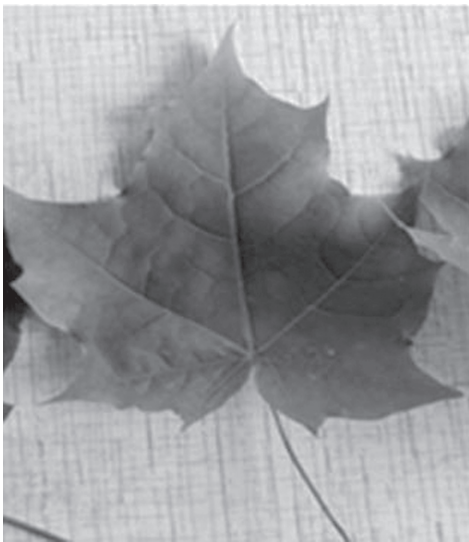
це тим, що на одних видах рослин віруси можуть викликати явні симптоми, а на інших до певного періоду перебувати в латентному стані. І навпаки, деякі віруси викликають характерні симптоми, тоді як інші важко виявити візуально. Крім того, існують подібні ознаки, спричинені неінфекційними захворюваннями рослин, наприклад, симптоми, що індукуються нестачею або надлишком поживних речовин і мікроелементів (K, Ca, Mg, Mo, Fe, S, Al, P, N Sn і Si), дія низьких і високих температур, нестача або надлишок вологи, порушення світлового режиму, вплив ґрунтових умов, отруйних речовин, механічні пошкодження, дія іонізуючих випромінювань. Крім того, подібні симптоми можуть спричиняти ентомошкідники і фітопатологічні захворювання, які індукуються, наприклад, фітоплазмами, віроїдами. Вірусна інфекція може впливати майже на всі процеси метаболізму рослини. Значно чутливими до вірусної інфекції є різні клітинні органели у рослин. Крім того, відбувається деструкція хлоропластів мітохондрій, крохмальних зерен, ендоплазматичного ретикулому та

ядра. За цих умов спостерігаються зміни забарвлення (пожовтіння, хлороз) листків, відмирання (некроз) або деформація листової пластинки, поява енацій.

Результати наших досліджень продемонстрували існування на платані і клені широкого спектра вірусоподібних симптомів, описаних у раніше проведених дослідженнях [7], що проявляються патологіями забарвлення і форми листа, росту та розвитку рослин загалом на всіх досліджуваних інфікованих рослинах *Platanus orientalis* L., *Acer platanoides* L. (рис. 1).

За сезонної динаміки розвитку вірусних захворювань на платані східному спостерігаються такі симптоми: поява дрібних хлоротичних плям на листовій пластині (травень); хлоротичні та некротичні формування (червень — липень); утворення продовгуватих некротичних ділянок між жилками листа (серпень — вересень); хлоротично-мозаїчних країв листової поверхні з хлоротичними плямами між жилками в центрі (вересень — жовтень).

Для визначення інфекційної природи захворювання досліджуваних рослин нами



а)



б)

**Рис. 1.** Некротичні симптоми на листі рослин: а) платана східного (*Platanus orientalis* L.), б) клена гостролистого (*Acer platanoides* L.)

було проведено біологічне тестування на рослинах-індикаторах. Як рослини-індикатори були висаджені рослини тютюну різних видів і сортів: *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, *N. tabacum* (сорт Samsun), *N. tabacum* (сорт Собалчський 3440) та *N. tabacum* (сорт Собалчський 193). Під час спостереження за інокульованими рос-

линами було встановлено розвиток таких симптом (рис. 2): некротизація та засихання листових пластинок рослин тютюну *N. tabacum* сорту Собалчський 3440, деформація листових пластинок рослин тютюну *N. tabacum* – Samsun та Собалчський 193, некротичні плями на тютюні *N. benthamiana*.



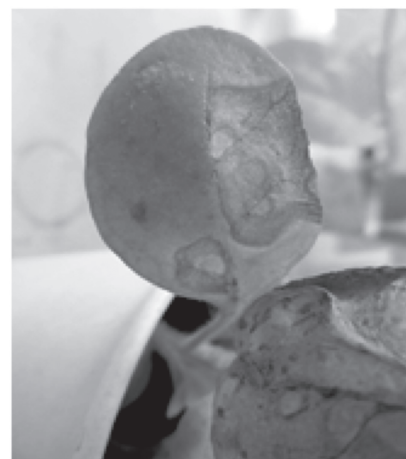
а)



б)



в)



г)

**Рис. 2.** Симптоми ураження вірусом рослин-індикаторів *Nicotiana tabacum*: а) некротизація та засихання листових пластинок рослин тютюну сорту Собалчський 3440, інокульованих гомогенатом з платана східного; б) деформація листових пластинок рослин тютюну сорту Samsun, інокульованих гомогенатом з клена гостролистого; в) деформація листових пластинок (сорт Собалчський 193), інокульованих гомогенатом з платану східного та г) некротичні плями на рослинах і *N. benthamiana*, інокульованих гомогенатом платана східного

Існування вірусів у листках платана та клена, а також рослин-індикаторів визначали на контролі непрямим методом імуноферментного аналізу.

Високий уміст фенольних сполук, нерівномірний розподіл вірусів на деревах і часто низькі концентрації патогену ускладнюють його виявлення в деревних рослинах за різних умов порівняно з трав'янистими.

Дослідження зібраних зразків дерев на вірусоносійство проводили шляхом детекції вірусних антигенів у рослинних екстрактах листків.

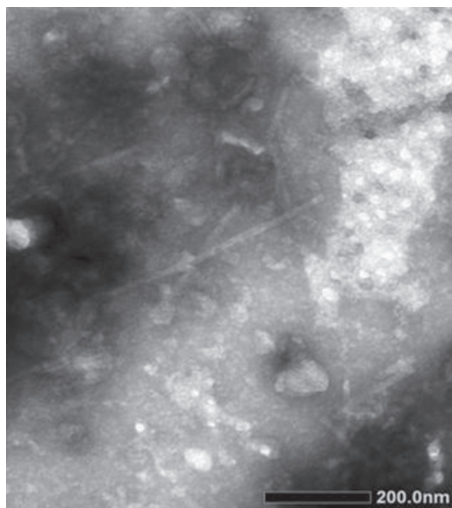
Імуноферментний аналіз дерев засвідчив, що всі зразки платана східного (*Platanus orientalis* L.) та клена гостролистого (*Acer platanoides* L.) містили антигени ВТМ. Найбільший уміст вірусних антигенів було детектовано у зразках, відібраних у травні та червні, про що свідчать значення оптичної густини  $E_{405}$  — 0,671 та 0,495 відповідно.

З відібраних за візуальними ознаками та імуноферментним аналізом зразків досліджуваного рослинного матеріалу та уражених рослин-індикаторів за допомо-

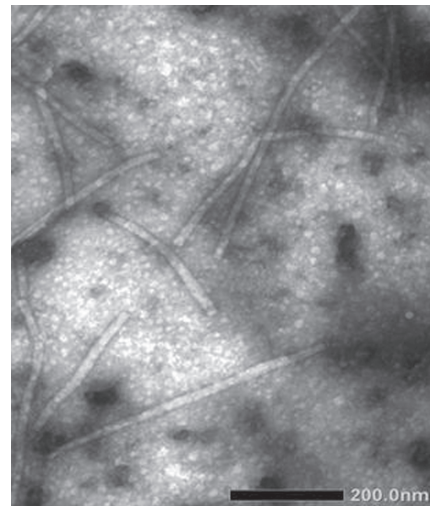
гою електронної мікроскопії було виявлено жорсткі паличкоподібні частки вірусу, розмір яких за розподілом варіаційної кривої найчастіше становив  $295 \times 18$  нм у листках платана та клена з Житомирської та Київської областей. Зауважимо, що ізолят ВТМ за електронно-мікроскопічного спостереження інколи траплявся разом з деякими іншими патогенами (карлавірус, іларвірус) (рис. 3).

Отже, останніми роками зроблено перші кроки в дослідженні поширення фітовірусів у лісових біоценозах. Відзначено існування відповідного зв'язку інфікування ВТМ дерев платана і клена, деяких однорічних трав'янистих рослин. Спостерігається тенденція до ураження ВТМ разом з карлавірусом, іларвірусом різних видів рослин у локальних екологічних нішах.

Було встановлено, що часто як проміжні носії і контаміновані резервуари для ВТМ можуть бути ґрунт, вода і навіть шапинкові гриби [12]. Відзначено, що з наближенням лісових біоценозів до полів у ґрунтах і воді, на деревах лісових масивів частіше починають траплятися ВТМ (*Tobamovirus*).



а)



б)

**Рис. 3.** Електроннографія вірусу тютюнової мозаїки, виділеного із: а) клена гостролистого (*Acer platanoides* L.) б) платана східного (*Platanus orientalis* L.)

## ВИСНОВКИ

Виявлено, що ВТМ має поширення серед рослин платана та клена на території Українського Полісся (Житомирська та Київська області).

Вірус часто інфікує рослини локально на певних територіях. Як профілактичний захід проти інфекції слід використовувати неінфікований садивний матеріал від якісних рослин-донорів. У технологічному процесі первинного вирощування рослин необхідно розробити систему діагностики та профілактики збудника в умовах спеціалізованих господарств. Значну увагу слід

звернути на застосування ІФА та методу біологічного тестування через рослини-індикатори, а також використання методу внутрішньоклітинних включень. Для зменшення інфекційного процесу на рослинах та підвищення їх росту і розвитку потрібно розробити технологію застосування біологічно активних речовин.

*Автори виносять подяку співробітникам кафедри вірусології ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за консультативну допомогу під час використання ІФА.*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Пристер Б.С. Проблемы сельскохозяйственной радиоэкологии и радиобиологии при загрязнении окружающей среды смесью продуктов ядерного деления / Б.С. Пристер. — Чернобыль, 2008. — 318 с.
2. Гудков І.М. Сільськогосподарська радіобіологія / І.М. Гудков, М.М. Віннічук. — Житомир, 2003. — 472 с.
3. Bachand G.D. Seasonal Pattern of *Tomato Mosaic Tobamovirus* Infection and Concentration in Red Spruce / G.D. Bachand, J.D. Castello // *Seedlings Appl Environ Microbiol.* — 1998. — No. 64. — P. 1436–1441.
4. Lana A.F. A virus isolated from sugar maple / A.F. Lana, O.T. Thomas, J.F. Peterson // *Phytopathol Z.* — 1980. — No. 97. — P. 214–218.
5. Nienhaus F. Viruses of forest trees / F. Nienhaus, J.D. Castello // *Annu Rev Phytopathol.* — 1989. — No. 27. — P. 165–186.
6. Бойко А.Л. Безпека і віруси / А.Л. Бойко // Екологічна безпека агропромислового виробництва; за ред. акад. О.І. Фурдичка, акад. А.Л. Бойка. — К.: ДІА, 2013. — С. 18–44.
7. Скринінг фітовірусів компонентів лісових екосистем та прилеглих територій / А.Л. Бойко, Н.О. Опришко, О.А. Бойко та ін. // *Агроекологічний журнал.* — 2015. — № 4. — С. 102–107.
8. Нечитайло В.Н. Систематика вищих рослин. Ч. II: Покритонасінні / В.Н. Нечитайло. — К.: Фітосоціоцентр, 1997. — 272 с.
9. Hill S.A. *Methods in plant virology* / S.A. Hill. — Oxford: Alden Press, 1984. — 167 p.
10. Crowther J.R. *Theory and practice* / J.R. Crowther. — N.Y.: Humana Press, 1995. — 96 p.
11. Антитела. — Кн. 2. Методы / под ред. Д. Кэтти. — М.: Мир, 1995 — 384 с.
12. Поліщук В.П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія» / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко. — К.: Фітосоціоцентр, 2005. — 204 с.

## REFERENCES

1. Prister B.S. (2008). *Problemy selskokhozyaystvennoy radioekologii i radiobiologii pri zagryaznenii okruzhayushchey sredy smesyu produktov yadernogo deleniya* [Problems of agricultural radioecology and radiobiology when environmental pollution is a mixture of the products of nuclear fission]. Chernobyl Publ., 318 p. (in Russian).
2. Hudkov I.M., Vinnichuk M.M. (2003). *Silskohospodarska radiobiologiya* [Agricultural radiobiology]. Zhytomyr, 472 p. (in Ukrainian).
3. Bachand G.D., Castello J.D. (1998). Seasonal Pattern of *Tomato Mosaic Tobamovirus* Infection and Concentration in Red Spruce, Seedlings Appl Environ Microbiol., No. 64, P. 1436–1441 (in English).
4. Lana A.F., Thomas O.T., Peterson J.F. (1980). A virus isolated from sugar maple, Phytopathol Z., No. 97, pp. 214–218 (in English).
5. Nienhaus F., Castello J.D. (1989). Viruses of forest trees, Annu Rev Phytopathol., No. 27, pp. 165–186 (in English).
6. Boiko A.L., Furdychko O.I. (2013). *Bezpeka i virusy* [Security and viruses]. *Ekologichna bezpeka ahro-promysloвого vyrobnytstva* [Ecological safety of the agricultural production]. Kyiv: DIA Publ., pp. 18–44 (in Ukrainian).
7. Boiko A.L., Opryshko N.O., Boiko O.A., Tarasenko H.A., Orlovskyi A.V., Orlovska H.M., Moroz V.V. (2015). *Skryminh fitovirusiv komponentiv lisovykh ekosystem ta prylyhlykh terytorii* [Screening fitovirusiv forest ecosystems and adjacent areas]. *Ahroekologichnyi zhurnal* [Agroecological journal]. No 4, pp. 102–107 (in Ukrainian).
8. Nychytailo V.N. (1997). *Systematyka vyshchyykh roslin. T. II Pokrytonasinni* [Systematics of higher

- plants. T. II Angiosperms]. Kyiv: Fitosotsiotsentr Publ., 272 p. (in Ukrainian).
9. Hill S.A. (1984). Methods in plant virology, Oxford: Alden Press, 167 p. (in English).
10. Crowther J.R. (1995). Theory and practice, N.Y.: Humana Press, 96 p. (in English).
11. Ketti D. (1995). *Antitela 2. Metody* [Antibodies 2. Methods]. Moskva: Mir, 384 p. (in Russian).
12. Polishchuk V.P., Budzaniivska I.H., Shevchenko T.P. (2005). *Posibnyk z praktychnykh zaniat do kursu «Zahalna virusolohiia»* [Guide to practical training course «General Virology»]. Kyiv: Fitosotsiotsentr Publ. 204 p. (in Ukrainian).

УДК 574.34: 632.95.02

## ЕКОЛОГІЧНЕ НАВАНТАЖЕННЯ НА МИСЛИВСЬКІ РЕСУРСИ АГРОЛАНДШАФТІВ ЗА ВИКОРИСТАННЯ ПЕСТИЦИДІВ

В.П. Новицький<sup>1</sup>, І.В. Шумигай<sup>1</sup>, С.М. Грищенко<sup>2</sup>, К.В. Маєвський<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут агроєкології і природокористування НААН

<sup>2</sup> Національний університет біоресурсів і природокористування України

*Розглянуто динаміку використання найпоширеніших груп пестицидів і чисельності корисної мисливської фауни в агроландшафтах України. Досліджено ступені пестицидного навантаження на популяції зайця сірого, куріпки сірої та фазана звичайного з початком ХХІ ст. Виявлено кореляційні зв'язки між обсягами застосування пестицидів та динамікою чисельності мисливської фауни агроландшафтів. Так, було встановлено сильний негативний зв'язок між обсягами застосування пестицидів та динамікою чисельності зайців. Незначне зростання спостерігалось щодо чисельності куріпки сірої та фазана звичайного. Також аналітичним показником всіх досліджень є коефіцієнт еластичності.*

**Ключові слова:** агроценози, пестициди, мисливські ресурси, динаміка чисельності популяцій.

Застосування пестицидів на орних землях нині залишається одним з найбільш згубних антропогенних чинників для польової фауни всього Європейського континенту [1–7]. Так, вчені наголошують, що негативна дія пестицидів на тварин полягає не тільки у безпосередньо спричиненій загибелі внаслідок гострого отруєння. Важливо, що хімічні речовини навіть у незначних дозах здатні погіршувати загальний стан живого організму, пригнічувати метаболічні процеси, призводити до його негативних морфологічних змін у репродуктивному апараті [8] та, зрештою, зумовлювати сповільнення темпів відновлення мисливських ресурсів загалом.

Слід зауважити, що вивченню реакцій ценопопуляцій польової фауни місцевих

агроценозів на кількісні зміни використаних пестицидів у ХХІ ст. досі приділялося недостатньо уваги. З огляду на це, метою наших досліджень було виявлення та екологічна характеристика зв'язків між обсягами застосування пестицидів та динамікою чисельності осілих видів мисливських тварин в умовах агроландшафтів України.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Агроландшафти України є основними стаціями для двох корисних видів птахів родини фазанових (*Phasianidae*), які ведуть осілий спосіб життя. Серед них куріпка сіра (*Perdix perdix* L.) — аборигенний вид, фоновий для сільськогосподарських угідь всіх природних зон держави; фазан звичайний (*Phasianus colchicus* L.) — інтродуцент, фоновий для південних та південно-західних регіонів країни. З-поміж корисних мислив-

© В.П. Новицький, І.В. Шумигай, С.М. Грищенко, К.В. Маєвський, 2016