

ЕФЕКТИВНІСТЬ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ХВОРОБ ТОМАТІВ

Е. Алдалаін

Т.П. Шевченко,

*кандидат
біологічних наук*

В.П. Поліщук,

Л.Т. Міщенко,

*доктори
біологічних наук*

*Київський
національний
університет
імені Тараса Шевченка*

Мета. Діагностика вірусних хвороб томатів і встановлення різноманітності вірусів, що циркулюють на території України та інфікують *Lycopersicon esculentum*. **Методи.** Візуальна діагностика, імуноферментний аналіз і трансмісійна електронна мікроскопія.

Результати. Наведено дані про детекцію деяких вірусів рослин, що інфікують томат звичайний (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Інфіковані рослини томата звичайного становлять 3, 1 – 22% від дослідних зразків і різняться залежно від виду вірусу та регіону досліджень.

Висновки. Установлено наявність антигенів вірусів родів *Tobamovirus* (PMMoV, ToMV), *Cucumovirus* (CMV), *Tobravirus* (TRV) та *Carlavirus* (PVM-to), що інфікують томат звичайний. Найрозповсюдженішими в дослідженнях виявилися віруси мозаїки томата та М-вірус картоплі (томатний ізолят).

Ключові слова: вірусні хвороби, *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Tobravirus*, *Carlavirus*, томат.

Хвороби рослин вважаються одними з агентів, які гальмують розвиток сільсько-го господарства. Спричинені захворювання практично не піддаються контролю, знижують урожайність і завдають значних економічних втрат сільському господарству [9]. Рослини *Lycopersicon esculentum* інфікують багато вірусів, найшкодочиннішими з яких є: вірус огіркової мозаїки, вірус аспермії томатів, вірус мозаїки томатів, неповірус кільцевої плямистості томатів, неповірус кільцевої плямистості тютюну, вірус плямистого в'янення томатів, вірус мозаїки пепіно [1, 10], X,-M- та Y-віруси картоплі [4].

Нині на культурі *Lycopersicon esculentum* з'являються нові віруси, які набувають широкого розповсюдження, зокрема вірус жовтої кучерявості верхівки томата, торадо вірус томата та вірус мозаїки пепіно [11].

Мета досліджень — установлення різноманітності вірусів, що циркулюють на території України та інфікують *Lycopersicon esculentum*.

Методика досліджень. Об'єктами досліджень були рослини *Lycopersicon esculentum* з вірусоподібними симптомами, відібрані з агроценозів у різних регіонах України. Метод

виявлення та відбору рослинного матеріалу за зовнішніми симптомами є найпростішим і найпоширенішим. Він заснований на здатності багатьох вірусів зумовлювати на рослинах характерні симптоми ураження, які виявляються у вигляді смуг на листових пластинках, деформації листових пластинок, укорочення стебел і пагонів, зміни забарвлення листя, появи некротичних плям на листках та ін. Для досліджень відбирали зразки рослин томата звичайного з характерними вірусними симптомами з Київської, Полтавської, Житомирської, Вінницької, Чернігівської областей та АР Крим.

Для детекції вірусних антигенів було використано імуноферментний аналіз (ІФА) у модифікації «сендвіч» із тест-системами виробництва Loewe (Німеччина). Його проводили в 96-лункових полістиролових планшетках «Labsystem» відповідно до рекомендацій виробника тест-систем. Рослинні зразки (вегетативні органи і плоди рослин) для ІФА готували гомогенізацією інфікованого рослинного матеріалу в 0,1М фосфатно-сольовому буфері + 0,001М ЕДТА у співвідношенні 1:2 з наступним центрифугуванням у режимі 4000 об./хв впродовж 20 хв за температури 4°C на центрифугі РС-6. Отриманий

гомогенат використовували для імуноферментного аналізу. Зразки аналізували на наявність антигенів вірусів: вірусу огіркової мозаїки; вірусу мозаїки томату; вірусу тютюнової мозаїки; вірусу брязкотіння тютюну; вірусу кільцевої плямистості томатів; вірусу слабкої крапчастості перцю; вірусу жовтої кучерявості верхівки томата. Результати реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsi MR (США) з програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink за довжин хвиль 405/630 нм [7]. Морфологію віріонів досліджували на електронних мікроскопах Jeogs (JEM 1400, JEM-1230), використовуючи як контрастер 2%-й ураніл ацетат і фосфовольфрамову кислоту [8].

Результати досліджень. На рослинах родини *Solanaceae* (томатах, перці та баклажанах) симптоми захворювання спостерігали через 1–1,5 міс. після сівби, у період бутонізації. Перші ознаки хвороби виявлялися на молодих листках у вигляді жовтуватих плям та просвітління тканини вздовж головних жилок. У подальшому на рослинах розвивалися симптоми жовтої або зеленої системної мозаїки, з'являлися хлорози та точкові некрози. Під час обстеження рослин траплялися різноманітні симптоми на листках і плодах. На листових пластинках спостерігали різні типи мозаїк за забарвленням (світло-зелена та жовто-зелена) і розміщенням (прижилкова та міжжилкова мозаїки), скручування листків угору «човником», також відзначали хлорози, ниткоподібність та деформації (див. рис. а–е на обкладинці).

Бронзового забарвлення листків, характерного для вірусу плямистого в'янення томатів, не траплялося. На плодах спостерігалися жовті плями неправильної форми або у вигляді кілець.

Симптоми, виявлені на рослинах, були подібними до тих, які спричиняють віруси, що уражують овочеві культури. До таких вірусів належить вірус огіркової мозаїки, вірус брязкотіння тютюну, вірус мозаїки томата, вірус тютюнової мозаїки, вірус кільцевої плямистості тютюну, вірус кільцевої плямистості томата та багато інших. Подібність симптомів на рослинах не дає змоги чітко визначити вид вірусу, тому подальші дослідження були спрямовані на встановлення виду вірусів з використанням додаткових методів. За допомогою ІФА модифікації «сендвіч» із тест-системами виробництва Loewe (Німеччина) проведено ідентифікацію

антигенів 8-ми вірусів у відібраних зразках *L. esculentum*. За аналізу отриманих результатів ІФА було визначено відсоток ураження зразків *L. esculentum* вірусними агентами щодо загальної кількості всіх зразків, задіяних у досліді (рис. 1).

Нами було встановлено наявність антигенів 5-ти вірусів: вірусу огіркової мозаїки; вірусу мозаїки томата; вірусу брязкотіння тютюну, вірусу слабкої крапчастості перцю та М-вірусу картоплі.

У Полтавській області 14,3% дослідних зразків томата звичайного уражено вірусом ToMV, 22% — МВК-то. У Житомирській області 7,1% дослідних зразків *Lycopersicon esculentum* уражено вірусом PMMoV. У Київській області 7,1% зразків томата звичайного також уражено цим вірусом, 7,1% зразків рослин — вірусом TRV, вірусом CMV контаміновано 21,4% зразків рослин томата звичайного. У Вінницькій області вірусом мозаїки томатів інфіковано 14,3% зразків рослин томата звичайного. В АР Крим 21,4% зразків рослин томата звичайного уражено вірусом ToMV. Найменш ураженими виявилися томати в Чернігівській обл. — усього контаміновано вірусом МВК-то 3,1%. Це підтверджує закономірність розповсюдження вірусів, тобто зменшення їх поширення в північних областях України [3].

Метод електронної мікроскопії було застосовано для прямого виявлення вірусів у зразках *Lycopersicon esculentum*, визначення

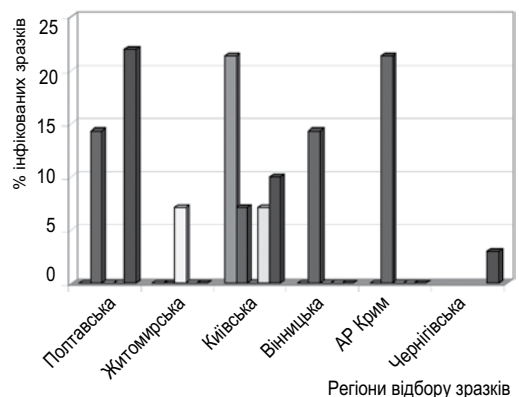


Рис. 1. Відсоткове співвідношення зразків *L. esculentum*, уражених вірусами родів *Tobamovirus*, *Cucumovirus*, *Tobravirus* у різних областях України: ■ — вірус огіркової мозаїки; ■ — вірус слабкої крапчастості перцю; ■ — вірус брязкотіння тютюну; ■ — М-вірус картоплі

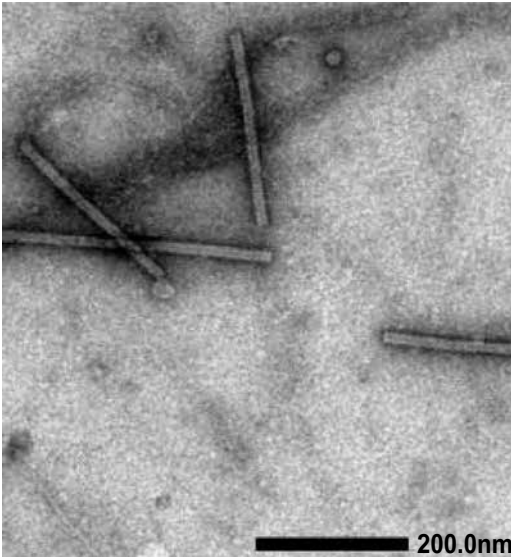


Рис. 2. Електронограма вірусу роду *Tobamovirus*

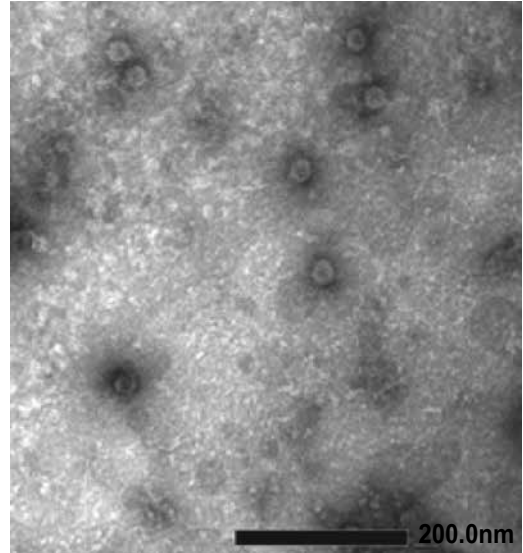


Рис. 3. Електронограма вірусу огіркової мозаїки

морфології, локалізації та розмірів віріонів. Саме результати ІФА було підтверджено методом електронної мікроскопії.

Під час електронно-мікроскопічних досліджень виявлено паличкоподібні віріони розміром $300 \pm 3 \times 19 \pm 3$ нм, що, за літературними даними, характерно для вірусів роду *Tobamovirus* (рис. 2).

Окрім того, було візуалізовано віруси сферичної форми діаметром 29 нм. За даними ІФА, їх ідентифіковано як вірус огіркової мозаїки, що за літературними даними [11] характерно для вірусів роду *Cucumovirus* (рис. 3).

Методом трансмісійної електронної мікроскопії встановлено, що розміри виявлених вірусів у листках томатів сорту Регіони становлять $610 \pm 25 \times 12,5$ нм (рис. 4).

Методом ІФА також визначено, що томат сорту Балада уражено МВК-то (томатний ізолят). М-вірус картоплі належить до роду *Carlavirus* родини *Betaflexiviridae*. За морфологією віріони МВК ниткоподібні, у середньому мають довжину 650 нм та діаметр 12 нм. Тобто вірус, виявлений на рослинах томата сорту Регіони, ідентифіковано до роду *Carlavirus*. Подібні результати щодо ураження вірусом МВК-то в Україні отримано авторами [4]. Вірус МВК на рослинах томатів виявлено також у Росії [12] і Китаї [6].

Під час досліджень з'ясувалося, що рослини *Lycopersicon esculentum* інфіковані вірусами ToMV, PMMoV, CMV, TRV та МВК-то,

що підтверджено результатами ІФА та ЕМ.

Результати електронно-мікроскопічних досліджень підтверджують дані імуноферментного аналізу та орієнтують на подальші дослідження стосовно розроблення та вдосконалення засобів захисту рослин томатів від вірусних інфекцій [2]. Діагностування вірусних хвороб томата звичайного їстівного є важливим етапом у технології вирощування екологічно безпечної продукції овочівництва. Адже використання хімічних сполук не завжди ефективне і безпечне, оскільки вірус локалізується в клітинах рослин [5].

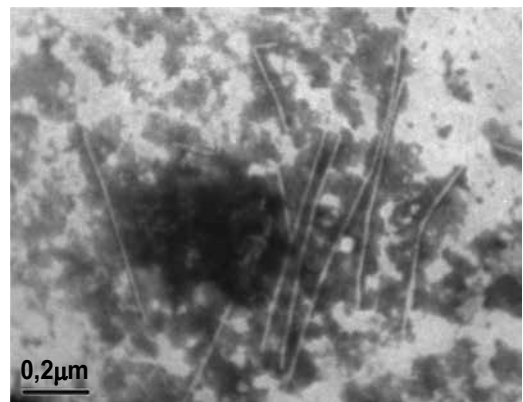


Рис. 4. Електронограма ниткоподібних віріонів, виявлених у листках помідорів сорту Регіони (JEOL, Японія)

Висновки

За результатами ІФА визначено наявність антигенів вірусів родів *Tobamovirus* (РММoV, ToMV), *Cucumovirus* (СМV), *Tobravirus* (TRV) та *Carlavirus* (PVM-to). Під час дослідження вірусних хвороб *L. esculentum* здебільшого траплялася моноінфекція. Найрозповсюдженішими в дослідженнях виявилися віруси мозаїки томата та М-вірус картоплі (томатний ізолят).

Один із дієвих способів боротьби з вірусами на томатах — це знищення бур'янів у полі і на прилеглих територіях. Слід дотримуватися всіх агротехнічних способів вирощування культури на належному рівні, що сприятиме зменшенню вірусного (інфекційного) навантаження на рослини та збільшенню виробництва екологічно безпечної продукції томатів.

Бібліографія

1. *Болезни и вредители овощных культур и картофеля*/[А. Ахатов, Ф. Ганнибал, Ю. Мешков и др.]. — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2013. — 463 с.
2. *Вірусні хвороби томатів в Україні: діагностика та методи боротьби: метод. реком.*/[Т.О. Руднева, Т.П. Шевченко, В.П. Поліщук, А.Л. Бойко]. — К.: ЦОП «Глобус», 2012. — 23 с.
3. *Мищенко Л.Т.* Вірусні хвороби озимої пшениці/Л.Т. Мищенко. — К.: Фітосоціоцентр, 2009. — 352 с.
4. *Мищенко Л.Т.* Властивості томатних ізолятів М- та Y-вірусів картоплі/Л.Т. Мищенко, А.А. Дуніч, О.І. Данілова, В.П. Поліщук//Мікробіолог. журн. — 2013. — Т. 75, № 2. — С. 89–97.
5. *Щербатенко І.С.* Використання природної та індукованої стійкості рослин для захисту їх від вірусних хвороб/І.С. Щербатенко//Мікробіол. журн. — 1998. — № 6. — С. 56–65.
6. *Characterization and complete nucleotide sequence of potato virus M isolated from tomato in China*/B.B. Ge, Z. He, D.M. Jiang [et al.]/Acta Virol. — 2012. — V. 56, №. 3. — P. 261–263.
7. *Crowther J.R.* ELISA. Theory and practice/J.R. Crowther. — Humana Press, N.Y. — 1995. — 223 p.
8. *Dijkstra J.* Practical Plant Virology: Protocols And Exercises/J. Dijkstra, Cees P. de Jager. — Berlin: Springer, 1998. — 459 p.
9. *Loebenstein Gad.* Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries/G. Loebenstein, G. Thottappilly. — Dordrecht: Springer Science+ Business Media Dordrecht, 2003. — 800 p.
10. *Identification of nepoviruses in tomato (Lycopersicon esculentum Mill.)*/D. Šneideris, I. Zitikaite, M. Žizyte et al.//Žemdirbystė=Agriculture. — 2012. — V. 99, № 2 — P. 173–178.
11. *Virus taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*/[A. King, M. Adams, E. Lefkowitz et al.]. — London: Academic Press, 2012. — 1327 p.
12. *Zavriev S.K.* The genome organization of potato virus M RNA/S.K. Zavriev, K.V. Kanyuka, K.E. Levay//Journal of General Virology. — 1991. — V. 72. — P. 9–14.

Надійшла 17.04.2015.