

Л.Т. Міщенко, А.А. Коренева, О.В. Молчанець, А.Л. Бойко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, 01601, Україна

ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН В УКРАЇНІ*

*Обстежено плантації лікарських рослин на наявність вірусних інфекцій. Виявлено рослини *Panax ginseng* С.А.Мейер, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L. із симптомами вірусного ураження. Інфекційна природа захворювань доведена методом біотестування. Методом електронної мікроскопії встановлено морфологію та розміри віріонів. Із рослин *Panax ginseng* С.А. Мейер виділено нитковидні віріони розмірами 1200х11, 2360х18, 525х11 нм та паличковидні – 320х17 і 95х15 нм. У рослинах *Plantago major* L. виявлено паличковидні вірусні частки розміром 270х15 нм. У надземній масі *Valeriana officinalis* L. детектовано нитковидні віріони розмірами 530х11 нм.*

Ключові слова: *Panax ginseng* С.А.Мейер, *Plantago major* L., *Valeriana officinalis* L., вірусні інфекції, рослини-індикатори, електронна мікроскопія, віруси лікарських рослин.

Цінність лікарських рослин полягає в їхній здатності синтезувати біологічно активні речовини, які характеризуються широким спектром фармакологічної дії та є природними індукторами захисних механізмів організму людини. Перевагою фітопрепаратів є те, що вони швидше й активніше включаються в біохімічні процеси людського організму, ніж синтетичні засоби, сприяючи тим самим ефективному лікуванню захворювань. Препарати з лікарських рослин, на відміну від синтетичних, рідко викликають ускладнення, особливо алергічного характеру. Все це зумовлює прагнення до одержання високих врожаїв та якості цінних лікарських рослин. Однак на сьогоднішній день природні запаси деяких дикорослих видів повністю або частково вичерпані, тому розширення сировинної бази багатьох лікарських рослин можливе тільки за рахунок їх культивування. Проте на цьому шляху зустрічається чимало труднощів, що стосуються організаційно-господарських, агротехнічних та інших аспектів вирощування лікарських культур. Серед культивованих в Україні лікарських рослин інтерес викликають женьшень справжній (*Panax ginseng* С.А.Мейер), валеріана лікарська (*Valeriana officinalis* L.) та подорожник великий (*Plantago major* L.).

Одержанню високих врожаїв рослин перешкоджають, насамперед, їх хвороби. Лікарські рослини уражуються різноманітними шкідниками, грибними та бактеріальними хворобами [2,7,9]. Крім грибів та бактерій, лікарські рослини уражуються вірусами [12]. Рослини *Plantago major* L. можуть інфікуватися вірусами, що належать до різних родин: *Carnation vein mottle potyvirus*, *Cherry rasp leaf nepovirus*, *Plantago 4 caulimovirus*, *Plantago mottle virus*, *Plantago mosaic virus*, *Plantago asiatica mosaic virus*, *Plantain virus X*, *Plantain virus 6*, *Plantain virus 7*, *Plantain virus 8*, *Tobacco mosaic virus* [4,14,17]. Культура женьшеню в умовах України уражується *Tobacco mosaic virus*, а також *Cucumber mosaic virus* [5]. Рослини валеріани уражуються *Cucumber mosaic virus*, *Alfalfa mosaic virus* [15], також можуть бути чутливими до інфікування *Watermelon mosaic 2 virus* [17].

Вірусні захворювання є серйозною загрозою у вирощуванні лікарських рослин, так як завдають їм подвійної шкоди: викликають суттєве зменшення врожаїв через пригнічений розвиток уражених рослин, а також є причиною значних змін вмісту та складу біологічно активних речовин, а, значить, і погіршення якості, тобто фармакологічної цінності сировини. Так, у рослинах дурману, інфікованого *Tobacco mosaic virus*, вміст алкалоїдів (основних активних речовин) знижується на 36,25 %, скополаміна – на 13,7 %. При ураженні *Potato virus Y* вміст соласодину зменшується на 19–25 % [13]. На сьогодні

* Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України на держзамовленні проєкт № 287/2008–2009.

нішній день грибні та бактеріальні захворювання, що уражують лікарські рослини, вивчені та описані детально, на відміну від вірусних.

Метою нашої роботи було виявлення вірусів у рослинах *Panax ginseng* С.А. Мейер, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L. і вивчення морфологічних властивостей їх збудників.

Матеріали і методи. Рослини подорожника великого та валеріани лікарської з симптомами, типовими для вірусного ураження, відбирали на плантаціях дослідної станції лікарських рослин Інституту агроєкології УААН (Березоточа, Полтавська обл.), рослини женьшеню справжнього – на плантаціях Київської області.

Виділення вірусів із уражених рослин *Panax ginseng* С.А. Мейер проводили згідно з методикою [5] та [8] у нашій модифікації.

Концентрацію одержаних вірусних препаратів визначали за методом Варбурга та Крістіана. Спектри поглинання вимірювали при довжинах хвиль 260 нм та 280 нм на спектрофотометрах «Specord» та СФ-26 [10].

Біологічне тестування здійснювали шляхом механічної інокуляції рослин-індикаторів у фазі двох справжніх листків очищеними вірусними препаратами із хворих рослин *Panax ginseng* С.А.Мейер і *Valeriana officinalis* L., а також соком уражених рослин *Plantago major* L. У ролі рослин-індикаторів слугували *Datura stramonium* L., *D. metel* L., *Nicotiana tabacum* L. сортів Імунний і Трапезон, *N. glutinosa*, *Solanum nigrum* L., *Chenopodium album*, *Chenopodium quinoa* Willd., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyen., *Phaseolus vulgaris* L. сорту Пінто.

Морфологію вірусних часток вивчали методом електронної мікроскопії. Негативне контрастування очищених вірусних препаратів проводили 2 % розчином фосфорновольфрамової кислоти протягом 2 хв [11]. Препарати досліджували за допомогою електронних мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та EM-125 (Суми, Україна).

Результати та їх обговорення. Проведені нами дослідження були зосереджені на виявленні та вивченні саме вірусних інфекцій. Протягом 2006–2007 років плантації лікарських рослин візуально обстежували на наявність захворювань. Виявлено та відібрано рослини, симптоми яких є типовими для вірусної інфекції.

При обстеженні культури женьшеню відбирали рослини різного віку (1–7-річні). Серед усіх обстежених рослин найбільш ураженими виявились 4-х та 5-річні, що є небезпечним для врожаїв, так як на цьому етапі онтогенезу рослини женьшеню починають інтенсивно зацвітати, утворювати плоди та набирати вагу коренів. На рослинах *Panax ginseng* С.А. Мейер спостерігали наступні симптоми: редукцію квітконосу та опадання плодів, рідше – затримку росту рослин. Найпоширенішими була вузьколистість, хлоротична мозаїка та сильна деформація листкової пластинки (рис. 1).

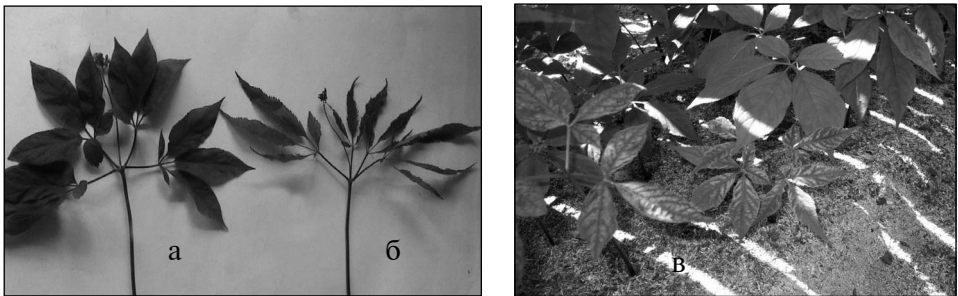


Рис. 1. Рослини *Panax ginseng* С.А.Мейер: здорові (а), з симптомами вузьколистості (б) та хлоротичної мозаїки (в)

На плантаціях *Plantago major* L. знайдено велику кількість уражених рослин, що характеризувалися зменшенням розмірів, сильною деформацією та звуженням листкової пластинки, інколи – мозаїчними симптомами (рис. 2).



а



б

Рис. 2. Рослини *Plantago major* L.: здорові (а)
та з симптомами деформації листової пластинки і мозаїчності (б)

Характерним симптомом захворювання *Valeriana officinalis* L. була карликовість рослин. Крім того, помічено редуцію квітконосу, слабо виражену мозаїку, зменшення кількості та розмірів листків.

Для вивчення морфологічних особливостей збудників та встановлення їх локалізації у рослині було досліджено листки хворих *Plantago major* L., *Panax ginseng* С.А.Мeyer, *Valeriana officinalis* L., а також плоди, корені та насіння уражених рослин женьшеню. Застосовуючи метод флотації у приготуванні препаратів для електронної мікроскопії, у соку хворих рослин *Plantago major* L. виявили паличководні вірусоподібні частки розміром 270×15 нм (рис. 3). У рослинах без симптомів ураження подібних часток не виявлено. Вірусоподібні частки, знайдені в надземній масі *Plantago major*, подібні до вірусів роду *Tobamovirus*, представники якого є паличкоподібними віріонами розмірами $300\text{--}310 \times 18$ нм та мають широке коло рослин-хазяїв.

Також методом флотації в плодах женьшеню детектовано нитковидні структури величиною 1200×11 нм, в насінні – паличкоподібні частки розміром 460×12 нм [6]. В коренях та листках уражених рослин женьшеню вірусних часток цим методом не було виявлено.

Для доказу інфекційної природи збудника, виявленого у соку *Plantago major* L., було застосовано метод біотестування. Захворювання передалось на *Chenopodium album* та *Ch. quinoa*. На інокульованих листках *Chenopodium album* на 16-й день з'являються 7–50 локальних некрозів коричневого кольору на 1 листок розмірами 1–2 мм у діаметрі. На 14-й день на *Chenopodium quinoa* утворились некрози у кількості 1–5 шт. на 1 листок, які були темно-коричневого кольору зі світло-коричневим ореолом розмірами 2–3 мм (рис. 4а). *Ch. quinoa* є рослиною-індикатором для біотестування вірусів багатьох родин і родів. У наших дослідженнях локальні некрози на цих рослинах найбільше нагадують реакцію на ураження вірусами роду *Tobamovirus*.

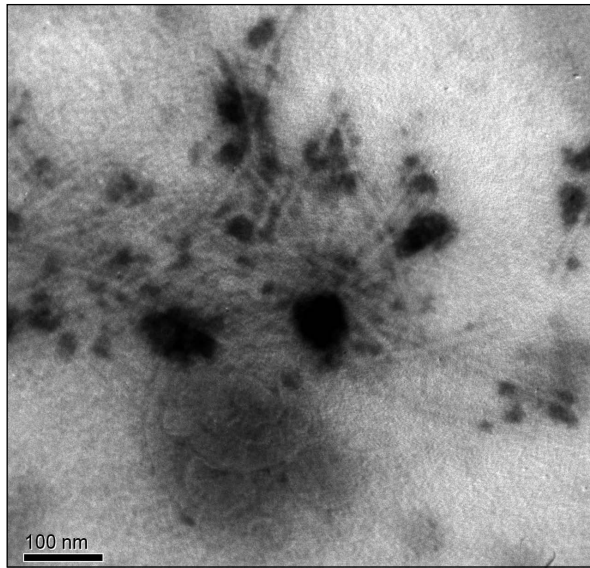


Рис. 3. Електроннограма часток вірусу, виявленого
в соку рослин *Plantago major* L. ($\times 40\,000$)

Для підтвердження інфекційності симптомів на рослинах *Panax ginseng* С.А. Меуер також використали метод рослин-індикаторів. Симптоми ураження на *Datura stramonium* з'явилися лише на 22-й день після інокуляції у вигляді некротичної реакції (1–4 некрози неправильної форми на 1 листок розмірами 1–2 мм, білого кольору зі світло-коричневим ореолом).

На 20-й день після інокуляції очищеним вірусним препаратом із *Valeriana officinalis* L. симптоми ураження у вигляді некротичної реакції (2–4 некрози на 1 листок розмірами 2–3 мм, коричневого кольору зі світло-коричневим ореолом) з'явилися на листках *Ch. amaranticolor*. Прореагували на зараження вірусним препаратом також рослини *Chenopodium quinoa* утворенням розпливчастих некротичних плям у кількості 3–4 шт. на 1 листок розмірами 6–7 мм, світло-коричневого кольору з коричневим ореолом (рис. 4б).

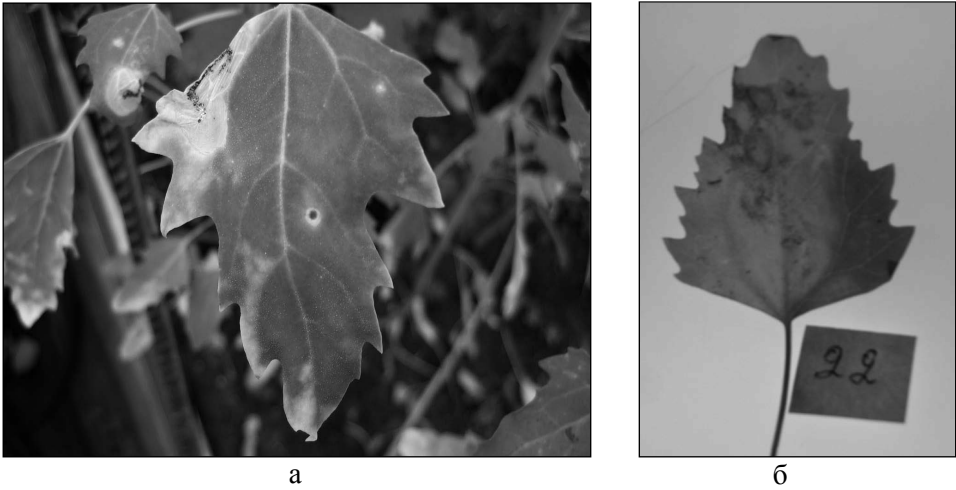


Рис. 4. Локальні некрози на *Ch. quinoa*, інокульованих вірусним препаратом із уражених рослин *Plantago major* L. (а); із рослин *Valeriana officinalis* L. (б)

Використовуючи вищеописані методики виділення вірусів із рослинного матеріалу, з листків хворих рослин *Panax ginseng* С.А. Меуер ізольовано нитковидні вірусні частки декількох розмірів, а саме: 525×11 нм (рис. 5г), 1200×11 нм [3] та 2360×18 нм (рис. 5а).

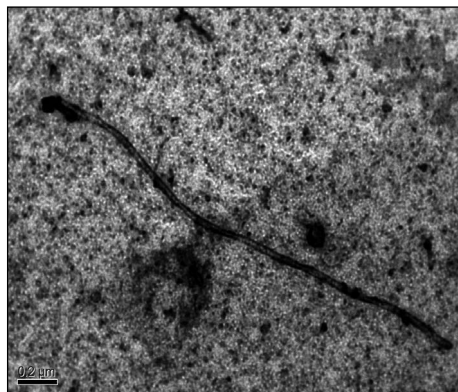
За морфологією та розмірами вірусні частки 2360×18 нм можна віднести до вірусів родини *Closteroviridae* роду *Closterovirus*. За даними літератури – це нитковидні віруси розмірами $1250–2200 \times 11–18$ нм, що викликають карликовість рослин, закручування листків, мозаїку та почервоніння листової пластинки, пізні утворення плодів, іноді недозрілих [17]. Деякі з цих симптомів, а саме: мозаїка, деформація листових пластинок, недозрілість плодів та редукція квітконосу були виявлені нами на рослинах *Panax ginseng*. Це дає підставу припущення, що виділені віруси належать до родини *Closteroviridae*.

Віруси 525×11 нм за розмірами та морфологічними особливостями подібні до представників роду *Potexvirus*, родини *Flexiviridae* [17].

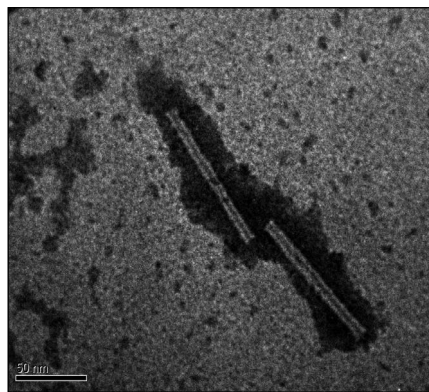
Крім нитковидних, у листках женьшеню були наявні паличковидні вірусні частки розміром 95×15 нм (рис. 5б). Ці віріони подібні до вірусів групи *Tobravirus*, які є паличковидними частками різної довжини: довгі ($180–215 \times 20–25$ нм) та короткі ($45–114 \times 20–25$ нм). У нашому випадку виділені з женьшеню віруси нагадують короткі частки з роду *Tobravirus* [1, 16].

Крім того, у рослинах женьшеню нами було виявлено ще один тип паличковидних вірусів (320×17 нм), які, згідно з літературними даними, подібні за морфологією до ВТМ [17] (рис. 5в).

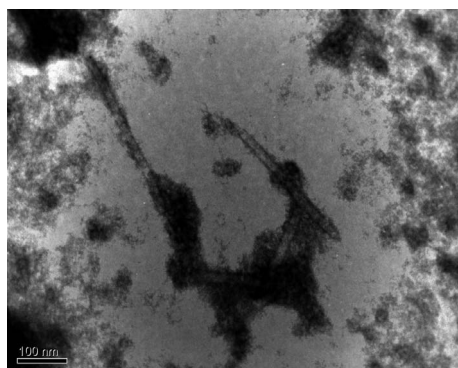
Застосовуючи методику очистки з використанням градієнта щільності хлористого цезію (30–50 %) [5], у листках 5-річних рослин женьшеню нами було виявлено нитковидні вірусоподібні частки розміром 470×13 нм. Одержана фракція розташовувалась у 40%-му CsCl .



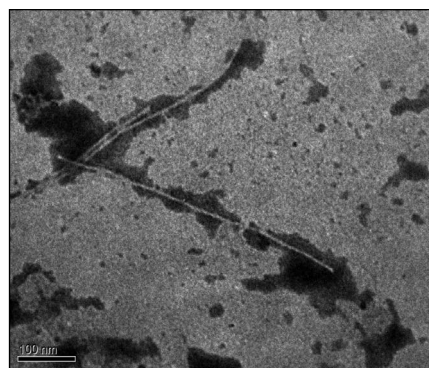
а



б



в



г

Рис. 5. Електронно-мікроскопічне зображення вірусних часток, виявлених у листках *Panax ginseng* С.А.Мейер

В коренях хворих рослин женьшеню не виявлено вірусних часток, на відміну від кореневих шийок.

Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що збудники, які спричиняють масове ураження рослин *Valeriana officinalis* L. на обстежених плантаціях, є нитковидними вірусними частками. В очищених та концентрованих препаратах із надземної частини рослин валеріани було знайдено нитковидні віріони розміром 530×11 нм (рис. 6).

Дослідження показали, що концентрація вірусу, виділеного з *Valeriana officinalis*, становила 2,6 мг/мл, з *Plantago major* – 1 мг/мл та з *Panax ginseng* – 1 мг/мл.

Після ідентифікації патогенів важливим та необхідним є визначення ступеня чистоти препарату. З метою порівняти одержані нами дані з літературними було визначено коефіцієнт оптичної щільності $E_{260/280}$, який становив для нитковидних віріонів, виявлених в женьшені, 1,36, для паличковидних – 1,21.

Результати наших досліджень, що стосувалися встановлення морфології та розмірів збудників виявлених захворювань, подано у таблиці.

Як видно з таблиці, вірусні частки, що були виділені нами з лікарських рослин, можна віднести до різних таксономічних родин фітовірусів. Так, аналізуючи симптоми

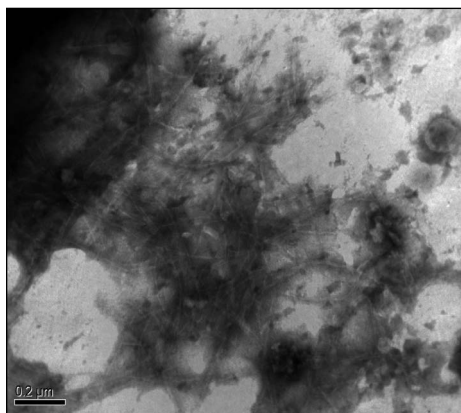


Рис. 6. Вірусні частки, виділені з надземної маси рослин *Valeriana officinalis* L.

уражених рослин, морфологію вірусів, тип реакції рослин-індикаторів, можна припустити, що вірусні частки, виявлені у плодах (1200×11 нм) та листках (1200×11 нм; 2360×18 нм) рослин *Panax ginseng*, подібні до вірусів родини *Closteroviridae* роду *Closterovirus*; нитковидні вірусні частки розмірами 525×11 нм — до родини *Flexiviridae*, роду *Potexvirus*. Також у женьшені знайдено паличковидні віріони розмірами 320×17 нм та 95×15 нм, які можна віднести до роду *Tobamovirus* та *Tobravirus* відповідно. Віруси, виявлені у рослинах *Plantago major*, за морфологічними особливостями та результатами біотестування нагадують віруси роду *Tobamovirus*, а вірусні частки *Valeriana officinalis* — до роду *Potexvirus*.

Таблиця

Морфологічні особливості збудників захворювань лікарських рослин

Рослина	Морфологічні ознаки	Розміри вірусних часток, нм	Таксономічне положення вірусу [17]
Женьшень справжній	нитковидні	1200×11; 2360×18	рід <i>Closterovirus</i> , родина <i>Closteroviridae</i>
	паличковидні	525×11	рід <i>Potexvirus</i> , родина <i>Flexiviridae</i>
		320×17 95×11	рід <i>Tobamovirus</i> рід <i>Tobravirus</i>
Подорожник великий	паличковидні	270×15	рід <i>Tobamovirus</i>
Валеріана лікарська	нитковидні	530×11	рід <i>Potexvirus</i> , родина <i>Flexiviridae</i>

Виявлення, ідентифікація та вивчення властивостей фітопатогенів із наступним створенням систематизованої бази даних про ураження рослин вірусними захворюваннями надасть можливість розробити науково-обґрунтовані заходи щодо захисту окремих лікарських культур та вести рентабельне виробництво лікарської рослинної сировини в Україні.

Л.Т. Мищенко, А.А. Коренева, О.В. Молчанец, А.Л. Бойко

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В УКРАИНЕ

Резюме

Обследованы плантации лекарственных растений на наличие вирусных инфекций. Выявлены растения *Panax ginseng* С.А. Meyer, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L. с симптомами вирусного поражения. Инфекционная природа заболеваний доказана методом биотестирования. Методом электронной микроскопии определены морфология и размеры вирионов. Из растений *Panax ginseng* С.А. Meyer выделены нитевидные вирионы размерами 1200×11, 2360×18, 525×11 нм и палочковидные — 320×17 и 95×15 нм. В растениях *Plantago major* L. выявлены палочковидные вирусные частицы размером 270×15 нм. В надземной массе *Valeriana officinalis* L. выявлены нитевидные вирионы размерами 530×11 нм.

Ключевые слова: *Panax ginseng* С.А. Meyer, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L., вирусные инфекции, растения-индикаторы, электронная микроскопия, вирусы лекарственных растений.

L.T.Mishchenko, A.A.Koreneva, O.V.Molchanets, A.L.Boyko

Taras Shevchenko Kyiv National University

DETECTION OF VIRAL INFECTION AGENTS IN MEDICINAL PLANTS IN CONDITIONS OF UKRAINE

Summary

Monitoring of viral infection on medicinal plant plantations is carried out. *Panax ginseng* С.А. Meyer, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L. with symptoms of viral infection were revealed. Viral nature of

symptoms was proved with biotesting method. Morphology and sizes of virus particles, detected in *Panax ginseng* method. Morphology and sizes of virus particles, detected in *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L., were determined with electron microscopy method.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у о р д с: *Panax ginseng* C.A.Meyer, *Valeriana officinalis* L., *Plantago major* L., viral infections, indicator-plants, electron microscopy.

Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s: A.A. Koreneva, Taras Shevchenko Kyiv National University; 64 Volodymyrska St., Kyiv, 01033, Ukraine.

1. *Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г.* и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1988. – 552 с.
2. *Иванюк В.Г., Голубева В.С., Кобзарова В.С.* Патогенная микобиота женьшеня // Защита растений. – Минск, 2004. – Т. 28. – С. 107–120.
3. *Коренєва А.А., Мищенко Л.Т.* Виявлення вірусної інфекції в рослин женьшеню // Екологія: Проблеми адаптивно-ландшафтного землеробства. – Івано-Франківськ, 2006. – С. 213–215.
4. *Костин В.Д., Волков Ю.Г.* Некоторые свойства вируса, поражающего подорожник азиатский // В кн.: Вирусные болезни растений Дальнего Востока. – Труды БПИ ДВН ЦАН СССР, т.25 (128). – Владивосток, 1976. – С. 205–210.
5. *Максименко Л.А., Пархоменко Н.И., Жук Е.Г., Диденко Л.Ф.* Выявление вирусов в растениях женьшеня, произрастающих в Украине // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14, № 5. – С. 467–471.
6. *Мищенко Л.Т., Коренєва А.А., Жук Е.Г.* Мониторинг вирусных инфекций женьшеня в Украине // Теоретические и прикладные аспекты интродукции растений как перспективного направления развития науки и народного хозяйства: Минск: Эдит ВВ. – 2007 – С. 220–222.
7. *Мурас В.А., Житкевич Н.В., Жук Е.Г.* Бактериальные болезни женьшеня на Украине // Микробиол. журн. – 1994. – Т. 56, № 1. – С. 84–85.
8. *Новиков В.К., Атабеков И.Г.* Метод получения Y – вируса картофеля и приготовления диагностических сывороток // Сельскохозяйственная биология. – 1982. – Т. 17, № 5. – С. 705–711.
9. *Поликсенова В.Д., Кобзарева В.С., Кориняк С.И.* Микозы культивируемых лекарственных растений // Пряно-ароматические и лекарственные растения: перспективы интродукции и использования: Материалы докладов международной конференции, 31 мая 1999. – Минск, 1999. – С. 99–101.
10. *Практикум по общей вирусологии /* Под ред. Атабекова И.Г. – Москва: Издательство Московского Университета, 1981. – 192 с.
11. *Салига Ю. Т., Снітинський В.В.* Електронна мікроскопія біологічних об'єктів. – Львів, 1999. – 152 с.
12. *Діденко Л.Ф., Варбанець Л.Д., Мандріка Т.Ю., Серденко О.Б., Броварська О.С., Васильєв В.М., Спивак М.Я.* Новий рабдовірус плямистості листя айру // Доповіді НАН України. – 2007. – № 5. – Р. 155–159.
13. *Хотин Ю.А.* Вирусные болезни лекарственных растений семейства пасленовых. Автореф. дис..... канд. биол.наук. – Москва, 1974. – 22 с.
14. *Шевченко Т.П.* Біологічні властивості ізолятів вірусу тютюнової мозаїки (Tobamovirus), виділених з різних регіонів України : Автореф. дис...канд. біол.наук. – Київ, 2001. – 18 с.
15. *Dikova B.* The viruses – Polyphages AMV and CMV on Some Oil-bearing and Medical Plants in Bulgaria. Book of Abstracts. Plant Protection Institute, Kostinbrod, Bulgaria, 2006. – P. 17.
16. *Polak Z., Kralik O., Cech M.* A Virus of Tobacco Rattle Group Naturally Occurring in Plantago sp. in Czechoslovakia. // Biol. Plant. – 1968. – V. 10 (1). – P. 31–36.
17. *Virus taxonomy.* Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / eds. M. H. V. van Regenmortel et al. – Academic Press. – 2000. – 1162 p.

Отримано 11.02.2008