

СЕРОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА Х-ВІРУСУ ХОСТИ В РОСЛИН РОДУ *HOSTA* TRATT.

Г.С. Щетиніна¹, А.В. Харіна¹, О.П. Перебойчук², І.Г. Будзанівська¹

¹ ННЦ «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

² Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України

Встановлено, що в екологічних умовах України існує Х-вірус хости. Методом ЗТ-ПЛР було проведено його виділення, очистку та отримано специфічну діагностичну сироватку. Обґрунтовано необхідність обмеження передачі цього патогену (у 2013 р. вірус занесено в реєстр очікування на включення до переліку карантинних збудників Європейської асоціації із захисту рослин — ЕРРО) у спосіб ранньої діагностики та перевірки посадкового матеріалу.

Ключові слова: Х-вірус хости, *Hosta Tratt.*, діагностична сироватка, рання діагностика.

Рід *Hosta* родини *Agavaceae* Dumort за даними різних авторів налічує 22–43 види та понад 7000 культиварів [1], природний ареал яких — Східно-Азійські області Голарктичного царства. Всі види є ендеміками Китайсько-Японського регіону. Найбільші центри культивування та гібридизації хости на сьогодні зосереджуються в США та Японії. Ці рослини популярні у країнах Європи, Канаді та Австралії.

В Україні попит на рослини роду *Hosta* зріс лише останнім часом. Тривалий час вважалося, що рослини роду *Hosta* є стійкими до ураження хворобами і шкідниками. Проте впродовж останнього десятиліття ХХ ст. виробники посадкового матеріалу почали фіксувати часту появу незвичних візерунків на листках рослин, які спочатку згруповували в окремі сорти.

Дослідження, проведені доктором Бенном Лок Хартом [1] із університету Міннесоти (США), засвідчили, що рослини можуть бути інфіковані багатьма вірусами, серед яких: *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Tomato ringspot virus* (ToRSV) та *Tobacco rattle virus* (TRV) [2]. Ці віруси характеризуються широким діапазоном біологічних векторів (комахи або нематод).

Окрім вищезгаданих вірусів, було виявлено невідомий вірус, який отримав назву — Х-вірус хости (ХВХ). У жовтні 2003 р. були опубліковані перші офіційні дані щодо його структури [3]. На відміну від перелічених вірусів, ХВХ не має векторної передачі, проте спричиняє значні збитки та становить серйозну загрозу для рослин. Повідомлення про виявлення ХВХ фіксують у багатьох країнах світу. Його розповсюдження набуває епідеміологічних розмірів. Постійно існує загроза розширення території циркуляції цього вірусу, що вже детектований на території Чехії, Фінляндії, Франції, Італії, Норвегії, Польщі, Китаю, Кореї, Канади, США, Нової Зеландії. Значна кількість інфікованих рослин перебуває у приватних колекціях садівників. Із промислових розплідників деяких з наведених країн культивари рослини роду *Hosta* імпортуються в Україну.

Х-вірус рослин хости є одним з видів роду *Potexvirus* і вважається основним збудником їх захворювання [4, 5] — зазвичай спричиняє мозаїку, хлороз, некроз, скручування, карликовість, деформацію, крапчастість, затримку росту. Встановлено, що ХВХ поширюється вегетативним та насінним розмноженням інфікованих рослин, а також механічним шляхом унаслідок потрапляння соку інфікованої рослини в пошкоджені тканини здорової [5–7].

Основними заходами із запобігання розповсюдженню вірусу є знищення інфікованих рослин. Тому зважаючи на всі обставини, Європейська асоціація із захисту рослин у серпні 2013 р. внесла ХВХ у реєстр очікування на включення до переліку карантинних збудників [8].

На території України рослини *Hosta* вирощують переважно в приватних колекціях та ботанічних садах. Одну з найбільших колекцій зібрано у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України (НБС НАН України).

Метою роботи було проведення моніторингу ХВХ в екологічних умовах України, отримання специфічної сироватки для ранньої діагностики та обстеження колекції видів *Hosta* для обмеження поширення патогену.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом слугували зразки рослин 21 сорту хости колекції НБС НАН України.

Були застосовані такі методи: *візуальної діагностики* — відбір зразків рослин *Hosta* здійснювали в два етапи. На першому етапі було відібрано рослини п'яти різних сортів, які, за даними літературних джерел, найчастіше уражаються ХВХ та мають типові симптоми; на другому — рослини 21 сорту. Всі відібрані рослини демонстрували нехарактерне їм кольорове забарвлення та структуру листка; *непрямого імуноферментативного аналізу* (ІФА) — проводили з використанням поліклональних антитіл Х-вірусу картоплі (ХВК) до серологічно спорідненого ХВХ; *виділення тотальної РНК* — з листя зразка *Hosta cv Sum and Substance* за допомогою реагенту RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Великобританія) була виділена тотальна РНК, з якою у подальшому проводили зворотню-транскрипційну полімеразу ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЛР); *полімеразно-ланцюгової реакції* — для підтвердження наявності ХВХ під час проведення ЗТ-ПЛР використали специфічну пару праймерів, що ампліфікують ділянку білка оболонки масою 706 [9]. Отриманий продукт гена капсидного білка ХВХ візуалізували за допомогою електро-

форезу в 1,5%-му агарозному гелі; виділення та очистки вірусу — проводили методом диференційного центрифугування, а чистоту вірусного препарату перевіряли спектрофотометрично, визначаючи співвідношення $E_{260}:E_{280}$, де E_{260} та E_{280} — коефіцієнти поглинання нуклеїнових кислот та амінокислот відповідно. За формулою Едельгоха визначали концентрацію препарату [10]; *електронної мікроскопії* — для візуалізації вірусних часток цим методом були виготовлені сіточки з формваровою плівкою-підкладкою, на які був нанесений очищений вірусний препарат, зразки контрастували у розчині ураніл ацетату [11]; *діагностичної антисироватки* — отримували специфічну антисироватку до ХВХ шляхом чотирьохкратної імунізації кроля вздовж хребта вірусом у концентрації 3,25 мг/мл. Через тиждень після останньої імунізації здійснювали прижиттєвий забір крові з дослідної тварини в об'ємі 20 мл, відбір сироватки та її доочищення шляхом низькошвидкісного центрифугування при 1,5 тис. об./хв упродовж 5 хв. Отриману сироватку розливали у пластикові пробірки обсягом 25 мкл та зберігали при температурі -20°C [12].

Методом непрямого ІФА визначали титр та робоче розведення антисироватки. Тест проводили на 96 лункових полістеролових планшетах, використовуючи як антиген очищений вірус. За допомогою імуноелектроблотингу визначали специфічність сироватки [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зразки листків уражених рослин *Hosta* відбирали за візуальними симптомами: мозаїка, системний хлороз, прижилковий, міжжилковий хлороз, знебарвлення листової пластинки, скручування та гофрування листка, потовщення листової пластинки, некроз.

У подальшому відібрані зразки перевіряли на зараження вірусом серологічними, електронно-мікроскопічними та молекулярними методами. Методом непрямого ІФА було протестовано 5 зразків у трикратній повторності (рис. 1).

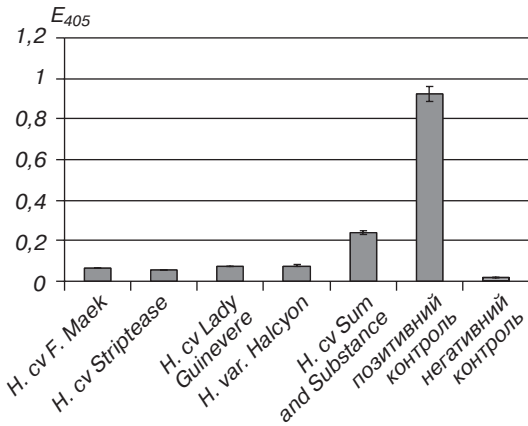


Рис. 1. Результати імуноферментативного аналізу різних сортів рослин *Hosta* на зараження серологічно спорідненим до Х-вірусу хости Х-вірусом картоплі

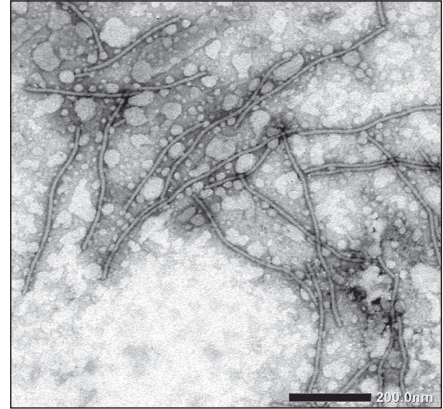


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне зображення Х-вірусу хости (Бар – 200 нм)

У зразку *Hosta* cv Sum and Substance був виявлений вірус, серологічно споріднений з ХВХ.

Для надійнішої детекції було здійснено оптимізацію ЗТ-ПЛР у спосіб використання специфічної пари праймерів до ділянки капсидного білка ХВХ.

Унаслідок візуалізації отриманого продукту ампліфікації у агарозному гелі було встановлено, що маса зразка *Hosta* cv Sum and Substance становить 706 пар основ. Це свідчить про те, що цей зразок уражено ХВХ. У подальшому зі зразків *Hosta* cv Sum and Substance здійснювали виділення та очистку цього вірусу.

Спектрофотометрично визначали концентрацію вірусу та рівень його чистоти. Так, концентрація препарату становила 3,1 мг/мл, рівень чистоти 1,09, що не набагато відрізняється від норми, що становить 1.

Очищений вірусний препарат використовували для приготування сіточок для електронної мікроскопії (рис. 2).

У зразках виявлено вірусні частки, розмір яких становить $470-580 \pm 20$ нм та 13 ± 1 нм у діаметрі, що за морфологічними характеристиками відповідає ХВХ.

Наступним кроком було отримання поліклональної сироватки до ХВХ. Якість антисироватки перевіряли у спосіб визна-

чення титру і специфічності до відповідного антигена.

Різновид титру та робоче розведення антисироваток встановлювали методом непрямого ІФА. Робоче розведення отриманої сироватки становить 1:8000 при титрі 1:32000.

Специфічність отриманої антисироватки визначали за допомогою методу імуноелектроблотингу. За взаємодії ізольованого ХВХ із гомологічними антитілами на нітроцелюлозній мембрані спостерігалася чітка смуга, яка за молекулярною масою була еквівалентною масі капсидного білка ХВХ, що свідчить про специфічність отриманої сироватки до ХВХ.

У процесі перевірки 56 рослин *Hosta* 21 сорту щодо ураження ХВХ методом ІФА, з використанням отриманих нами діагностичних антитіл, була встановлена позитивна реакція у зразках 5 різних сортів (рис. 3).

ВИСНОВКИ

За використання отриманої антисироватки методом ІФА проведено діагностику ХВХ у рослинах *Hosta* – 56 рослин 21 сорту колекції НБС НАН України. За результатами цього тестування було встановлено інфікування ХВХ п'яти сортів рослин *Hosta*,

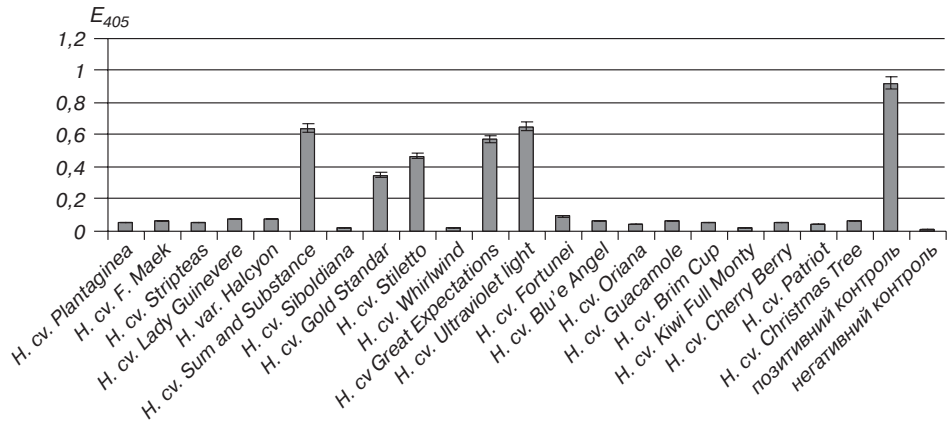


Рис. 3. Результати імуноферментативного аналізу зі специфічною антисироваткою до Х-вірусу хости

a same: Halcyon, Stiletto, Sum and Substance, Great Expectations, Ultraviolet light.

Зважаючи на широке використання рослин *Hosta* в озелененні та ландшафтному дизайні, в екологічних умовах України необхідно здійснювати контроль посадкового матеріалу щодо зараження на ХВХ та його розповсюдження за допо-

могою ранньої діагностики методом ІФА (з отриманою нами антисироваткою). На сьогодні у світі не існує ефективного лікування вірус-інфікованих рослин, єдиною можливим способом уникнути розповсюдження зараження ХВХ є вчасна діагностика та знищення інфікованої рослини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Zilis M.R. The Hostapedia. An Encyclopedia of Hosta / M.R. Zilis // Rocheller IL: Q& Nursery. — 2009. — P. 1128. — <http://www.plantsgalore.com/people/hostaphiles/000-hostaphile-Z.htm>
2. Lewandowski D.J. Hosta virus X / D.J. Lewandowski // Fact sheet, Agriculture and Natural Resources. — 2008. — P. 1–2. — <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/3000/pdf/3069.pdf>
3. Blanchette B. Hosta virus X: A three-year study / B. Blanchette, B. Lockhart // Hosta Journal. — 2003. — Vol. 35. — P. 19–23.
4. Currier S. Lockhart BEL. Characterization of a potexvirus infecting Hosta spp. // Plant Dis. — 1996. — Vol. 80. — P. 1040–1043.
5. Park M.H. Molecular evidence supporting the classification of Hosta virus X as a distinct species of the genus Potexvirus / M.H. Park, K.H. Ryu // Arch Virol. — 2003 — Vol. 148. — P. 2039–2045.
6. Ryu K.H. Characterization and seed transmission of Hosta virus X isolated from Hosta plants / K.H. Ryu, M.H. Park, M.Y. Lee // Acta Hort. — 2006. — Vol. 722. — P. 91–94.
7. Smitt S. Hosta virus X / S. Smitt, R. Gergerich, J. Robbins // Agriculture and Natural Resources. — 2006. — No. 8. — P. 36–54.
8. Zucchini green mottle mosaic virus is a new tobamovirus; comparison of its coat protein gene with that of kyuri green mottle mosaic virus / K.H. Ryu, B.E. Min, G.S. Choi et al. // ArchVirol. — 2000. —Vol. 145. — P. 2325–2333.
9. OEPP Service d'Information / M.T. Windham, J.K. Moulton, M.R. Hajimorad // EPPO Reporting Service PARIS. — 2013. — Vol. 8. — P. 175.
10. Гнущова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений / Р.В. Гнущова. — М., 1993. — 301 с.
11. Поліщук В.П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія» / В.П. Поліщук, І.Г. Будзанівська, Т.П. Шевченко. — К., 2005. — 153 с.
12. Currier S. Characterization of a potexvirus infecting Hosta spp. / S. Currier, B.E.L. Lockhart // Plant Dis. — 1996. — Vol. 80. — P. 1040–1043.

REFERENCES

1. Zilis M.R. (2009). The Hostapedia. An Encyclopedia of Hosta. Rocheller IL: Q& Nursery. P. 1128 (in English).
2. Lewandowski D.J. (2008). Hosta virus X. Fact sheet, Agriculture and Natural Resources, pp. 1–2 (in English).

3. Blanchette B. Lockhart B. (2003). Hosta virus X: A three-year study. *Hosta Journal*, Vol. 35, pp. 19–23 (*in English*).
4. Currier S. (1996). Lockhart BEL. Characterization of a potexvirus infecting *Hosta* spp. *Plant Dis.*, Vol. 80, pp. 1040–1043 (*in English*).
5. Park M.H., Ryu K.H. (2003). Molecular evidence supporting the classification of Hosta virus X as a distinct species of the genus Potexvirus. *Arch Virol.*, Vol. 148, pp. 2039–2045 (*in English*).
6. Ryu K.H., Park M.H., Lee M.Y. (2006). Characterization and seed transmission of Hosta virus X isolated from *Hosta* plants. *Acta Hort.*, Vol. 722, pp. 91–94 (*in English*).
7. Smitt S., Gergerich R., Robbins J. (2006). Hosta virus X. *Agriculture and Natural Resources*, pp. 36–54 (*in English*).
8. Ryu K.H., Min B.E., Choi G.S., Choi S.H. (2000). Zucchini green mottle mosaic virus is a new tobamovirus; comparison of its coat protein gene with that of kyuri green mottle mosaic virus. *Arch Virol.*, Vol. 145, pp. 2325–2333 (*in English*).
9. Windham M.T., Moulton J.K., Hajimorad M.R. (2013). EPPO Reporting Service PARIS, Vol. 8, p. 175 (*in English*).
10. Gnutowa R.V. (1993). *Serologiya i imunokhimiya virusov rasteniy* [Serology and immune-chemistry of plant viruses]. Moscow, pp. 165–169 (*in Russian*).
11. Polishchuk V.P., Budzanivska I.H., Shevchenko T.P. (2005). *Posibnyk z praktychnykh zaniat do kursu «Zahalna virusolohiia»* [Guide to practical lessons for the course «General Virology»]. Kiev. 153 p. (*in Ukrainian*).
12. Currier S., Lockhart B.E.L. (1996). Characterization of a potexvirus infecting *Hosta* spp. *Plant Dis.*, Vol. 80, pp. 1040–1043 (*in English*).

УДК 574.3:579.26

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ РОСЛИН РОДУ *LEMNA* ЩОДО ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

О.В. Гулай

Інститут агроекології і природокористування НААН

Досліджено біологічну активність рослин роду Lemna на популяціях патогенних бактерій Erysipelothrix rhusiopathiae. Встановлено, що прижиттєві виділення рослин роду Lemna мають стимулюючий вплив на бактерії E. rhusiopathiae, а інтенсивність впливу залежить від рівня розведення виділень рослин. В умовах прісноводних екосистем у формаціях рослин Lemna trisulca, Lemna minor та Spirodela polyrrhiza можуть складатись сприятливі умови для існування патогенних бактерій E. rhusiopathiae, що необхідно враховувати під час господарської діяльності.

Ключові слова: *Lemna trisulca, Lemna minor, Spirodela polyrrhiza, Erysipelothrix rhusiopathiae.*

Прісноводні екосистеми України характеризуються чисельним видовим різноманіттям та складними міжвидовими зв'язками, що поєднують усі компоненти в єдину збалансовану систему. Важливу роль у цьому відіграють угруповання рослин — фітоценози, які своєю діяльністю значною мірою визначають особливості та напрям розвитку екосистем. Здатність рослин через зміни параметрів середовища існування впливати на інші види живих організмів, формуючи навколо себе спе-

цифічні угруповання, була відома здавна [1]. Зокрема, привертає до себе увагу дослідження впливу прісноводних рослин на виживання збудників захворювань людини та тварин, для яких одним із чинників їх передачі є вода відкритих водойм [2]. Патогенні бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* здатні тривалий час існувати в об'єктах навколишнього природного середовища, у т.ч. і водоймах. У разі потрапляння до організму людини та тварин ці мікроорганізми спричиняють захворювання, такі як бешиха свиней, краснуха натуралістів, повзуча