

Віруси орхідних Чорноморського біосферного заповіднику

ПЕРЕГУДОВА ОЛЕКСАНДРА СЕРГІЇВНА
КОРОТЄЄВА ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА
КОМПАНЕЦЬ ТАРАС АНАТОЛІЙОВИЧ
ПОЛЩУК ВАЛЕРІЙ ПЕТРОВИЧ

PEREGUDOVA A.S., KOROTYEYEV G.V., KOMPANETS T.A., POLISCHUK V.P. (2014). **Viruses of orchids of Chornomorski Biosferical Reserve.** *Chornomors'k. bot. z.*, **10** (1): 114-119. doi: 10.14255/2308-9628/14.101/12.

The plants of *Orchis picta* Loisel. collected in Chornomorski Biosferical Reserve were observed. The infectivity of plant sap and viral capability to transmit in mechanical manner were confirmed. The spherical particles with diameter about 50 nm and 80-100 nm were observed in preparations from test-plants' symptomatic leaf in transmission electron microscope. According to viral morphology these pathogens of *O. picta* may be members of *Caulimoviridae* and *Tospovirus* respectively.

Key words: orchids, viruses, native flora

ПЕРЕГУДОВА О.С., КОРОТЄЄВА Г.В., КОМПАНЕЦЬ Т.А., ПОЛЩУК В.П. (2014). **Віруси орхідних Чорноморського біосферного заповіднику.** *Чорноморськ. бот. ж.*, **10** (1): 114-119. doi: 10.14255/2308-9628/14.101/12.

Проведено обстеження рослин *Orchis picta* Loisel, відібраних у Чорноморському біосферному заповіднику, на наявність вірусних інфекцій. Була доведена інфекційність соку, а також можливість механічної передачі вірусу. Методом трансмісивної електронної мікроскопії у зразках хворих рослин були виявлені два типи сферичних вірусоподібних часток, діаметром приблизно 50 нм та 80-100 нм. Відповідно до морфологічних особливостей віруси, виділені з рослин *O. picta*, можуть належати до родини *Caulimoviridae* та роду *Tospovirus* відповідно.

Ключові слова: орхідні, віруси, природна флора

ПЕРЕГУДОВА А.С., КОРОТЄЄВА А.В., КОМПАНЕЦЬ Т.А., ПОЛЩУК В.П. (2014). **Вирусы орхидных Черноморского биосферного заповедника.** *Черноморск. бот. ж.*, **10** (1): 114-119. doi: 10.14255/2308-9628/14.101/12.

Проведено обследование растений *Orchis picta* Loisel, отобранных на территории Черноморского биосферного заповедника, на наличие вирусных инфекций. Доказана инфекционность сока, а также возможность механической передачи вируса. Методом трансмиссионной электронной микроскопии были детектированы два типа сферических вирусоподобных частиц, диаметром около 50 нм и 80-100 нм. Согласно морфологическим особенностям вирусы, выделенные из растений *O. picta*, могут быть представителями семейства *Caulimoviridae* и рода *Tospovirus* соответственно.

Ключевые слова: орхидные, вирусы, природная флора

Родина *Orchidaceae* Juss. – одна з найбільш чисельних родин покритонасінних рослин, що налічує понад 35 тисяч видів. Представники цієї родини поширені на всіх континентах земної кулі, крім полярних областей та пустель [CHEREVCHENKO, 1993]. Вірусні захворювання орхідних відомі ще з середини ХХ сторіччя [JENSEN, 1950], і сьогодні вже описано понад 30 вірусів, здатних інфікувати представників родини *Orchidaceae* Juss. [ZETTLER et al., 1990, ZHENG Y.-X., JAN F.-J., 2011]. Більша частина цих

вірусів відомі як патогени тропічних та субтропічних орхідей, що вирощуються в умовах *in situ*. Віруси терестріальних орхідних помірної кліматичної зони вивчені значно гірше. На сьогодні в Європі описані випадки ураження інтродукованих видів орхідних родів *Cypripedium*, *Orchis*, *Ophrys* вірусом мозаїки турнепсу та вірусом погремковості тютюну [LESEMANN, VETTEN, 1985]. Крім того, при дослідженні орхідних природної флори України серед зразків, відібраних на території Криму та Карпат, були ідентифіковані вірусні антигени вірусів жовтої мозаїки квасолі, погремковості тютюну, аспермії томатів та мозаїки арабісу [KOROTEYEVA, POLISCHUK, 2004].

Усі орхідні природної флори України занесені до Червоної книги України [СНЕРВОНА ..., 2009]. Вони характеризуються високою чутливістю до природних змін та антропогенних факторів. Віруси, як біотичний чинник, здійснюють безпосередній вплив на загальний стан генофонду популяцій рослин. Дослідження вірусних інфекцій в природних ценозах дикорослих рослин є актуальним питанням збереження різноманіття рослинного світу та однією з найважливіших проблем оздоровлення довкілля. Метою даної роботи було обстеження орхідних, що зростають на території Чорноморського біосферного заповіднику, на наявність вірусних захворювань.

Матеріали та методи

Для дослідження вірусів орхідних природної флори України на території Солоно-озерної ділянки Чорноморського біосферного заповіднику в двох різних локалітетах були відібрані рослини *Orchis picta* Loisel. – зразки *O. picta*-1 та *O. picta*-2.

Віруси ідентифікували за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) в модифікації DAS-ELISA [GNUTOVA, 1993]. Для проведення ІФА зразки орхідних гомогенізували з додаванням 0,1М фосфатно-сольового буферу (рН 7,4) у співвідношенні 1:3 (m/v). Низькошвидкісне центрифугування здійснювали за допомогою центрифуги РС-6 при 5000 об/хв протягом 20 хв. Для діагностики вірусних антигенів використовували сироватки до вірусів аспермії томатів, мозаїки арабісу, плямистого в'янення томатів, некротичної плямистості бальзамину, огіркової мозаїки, погремковості тютюну, кільцевої плямистості тютюну, кільцевої плямистості томатів та У-вірусу картоплі (Loewe (Германія), Prime Diagnostics (Нідерланди)).

Біологічні властивості патогенів орхідних вивчали на спектрі рослин-індикаторів: *Amarantus caudatus* L., *Brassica oleraceae* L., *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Cucumis sativus* L., *Datura stramonium* L., *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana alata* Link et Otto, *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana tabacum* L., *Nicotiana rustica* L., *Petunia × atkinsiana* D. Don ex Loudon, *Phaseolus vulgaris* L., *Tetragonia expansa* Murr., *Zinnia elegans* Jacq. Ураження рослин-індикаторів проводили на ранніх стадіях розвитку методом механічної інокуляції.

Морфологію віріонів вивчали методом трансмісивної електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопу марки JEOL-1400 (Японія), при інструментальному збільшенні 40000 та 60000. Препарати контрастували 2 % водним розчином уранілацетату.

Результати та їх обговорення

Для ідентифікації вірусів у зразках орхідних природної флори було проведено імуноферментне тестування з сироватками до вірусів, типових для агроценозів України, та до раніш детектованих вірусів орхідних [KOROTEYEVA, POLISCHUK, 2004]. На жаль, з даними сироватками жодного позитивного результату отримано не було.

Для підтвердження інфекційної природи захворювань *O. picta* проводили біологічне тестування на спектрі рослин-індикаторів, типових для багатьох вірусів декоративних рослин [BRUNT et al., 1996, NAVALINSKIENĖ, SAMUITIENĖ, 2006]. При

ураженні рослин-індикаторів соком орхідних спостерігали розвиток лише системної реакції – симптоми проявлялись на 6-7 тижні після інфікування (табл. 1).

Таблиця 1

Реакція рослин-індикаторів при інокуляції соком рослин *O.picta*

Table 1

Reaction of-test plants inoculated with sap from *O. picta*

Рослина-індикатор	Симптоми при інокуляції соком орхідних	
	<i>O. picta</i> -1	<i>O. picta</i> -2
<i>Amarantus caudatus</i> L.	Мозаїка, крапчастість	—
<i>Brassica oleracea</i> L.	—	—
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn	Зів'янення	Прижилкові хлорози
<i>Cucumis sativus</i> L.	—	—
<i>Datura stramonium</i> L.	—	—
<i>Gomphrena globosa</i> L.	—	—
<i>Nicotiana alata</i> Link et Otto	—	М'яка мозаїка
<i>Nicotiana benthamiana</i> Domin	—	—
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	—	—
<i>Nicotiana rustica</i> L.	—	—
<i>Petunia ×atkinsiana</i> D. Don ex Loudon	Деформація	—
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	—	—
<i>Tetragonia expansa</i> Murr.	Деформація, пожовтіння, зів'янення	Пожовтіння, зів'янення, системні некротичні пошкодження
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	—	—

Як видно з таблиці, реакція рослин-індикаторів на ураження соком різних зразків орхідних не була подібною. Рослини, інфіковані соком *O. picta*-1, реагували наступним чином: на листках *A. caudatus* розвивалась мозаїка та крапчастість (рис.1), на рослинах *C. amaranticolor* спостерігали зів'янення листя, на *P. hybrida* виникала деформація листових пластинок, а на рослинах *T. expansa* спостерігали як зів'янення листя, так і їх деформацію. При ураженні соком *O. picta*-2 на листі *C. amaranticolor* виникали прожилкові хлорози (рис. 2), на листках *N. alata* розвивалась м'яка мозаїка, а на *T. expansa* спостерігали пожовтіння та зів'янення листя, а також появу їх некротичних пошкоджень. Таким чином, рослини-індикатори не проявляли чітких симптомів, характерних для описаних вірусів орхідних [BRUNT et al., 1996].



Рис. 1. Мозаїка на листках рослин *Amarantus caudatus* L.

Fig. 1. Mosaic symptoms on the leaves of *Amarantus caudatus* L.

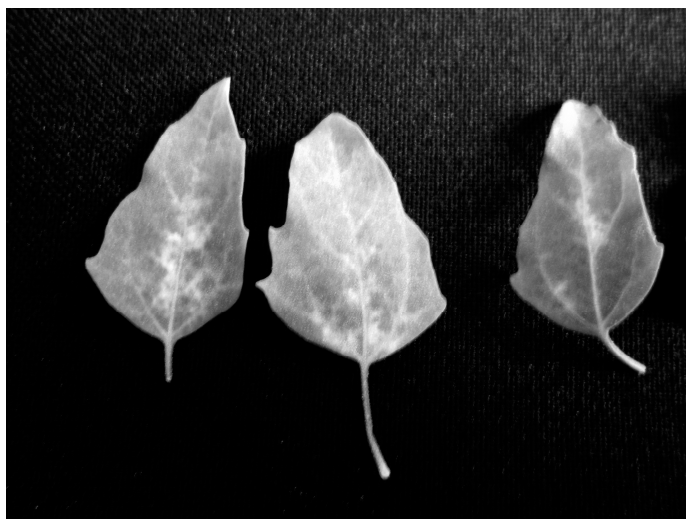


Рис. 2. Прижилкові хлорози на листі *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn.

Fig. 2. Vein chlorosis symptoms on the leaves of *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn.

Для вивчення морфології патогенів *O. picta* провели електронно-мікроскопічні дослідження соку рослин-індикаторів з чіткими симптомами системного ураження: *A. caudatus*, інфіковані соком *O. picta*-1 та *C. amaranticolor*, інфіковані *O. picta*-2.

Під час електронно-мікроскопічного дослідження соку *A. caudatus* було виявлено наявність у зразках сферичних вірусоподібних часток діаметром близько 50 нм (рис. 3).

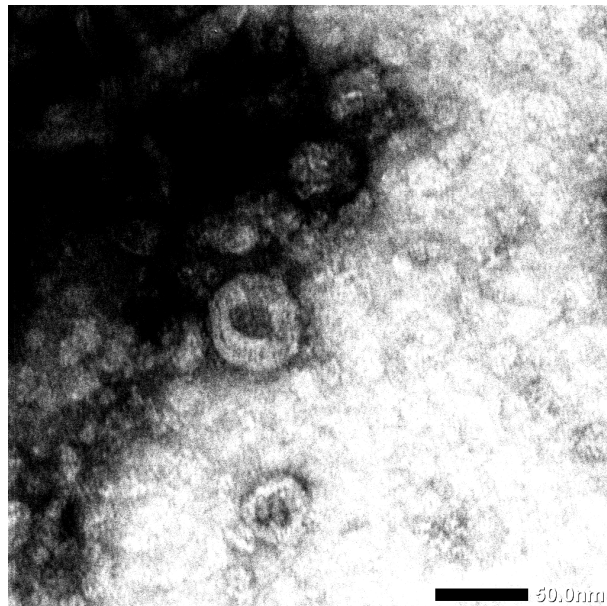


Рис. 3. Електронно-мікроскопічне зображення вірусоподібних часток у соку інфікованих рослин-індикаторів *A. caudatus* (бар 50 нм).

Fig. 3. Electron micrograph of virus-like particles in the sap of infected test-plants *A. caudatus* (bar 50 nm).

За літературними даними, сферичні віріони такого розміру характерні лише для представників родини *Caulimoviridae*: родів *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Soymovirus* [VIRUS TAXONOMY... 2012]. Більшість представників даних родів здатні

передаватися механічним шляхом, але віруси червоної кільцевої плямистості чорниці, скручування листя цеструму, просвітління жилок петунії та просвітління жилок тютюну передаються лише за допомогою векторів. Оскільки методом механічної інокуляції доведена інфекційність соку *O. picta*-1, то детектований патоген цих орхідних не може належати до вищезазначених вірусів.

У результаті проведення електронної мікроскопії у зразках *C. amaranticolor* були виявлені сферичні вірусоподібні частки діаметром 80-100 нм (рис. 4). Такий тип морфології віріонів характерний для представників роду *Tospovirus*. За літературними даними, на території Європи поширені наступні представники роду *Tospovirus*: вірус плямистого в'янення томатів, вірус некротичної плямистості бальзаміну, вірус жовтої плямистості ірисів, вірус некрозів стебла хризантем та вірус кільцевої плямистості гірчаку [PAPPU et al., 2009]. Оскільки зразки соку *O. picta*-2 не прореагували з сироватками до вірусів плямистого в'янення томатів та некротичної плямистості бальзаміну, то дані патогени не можуть бути збудниками захворювань *O. picta*.

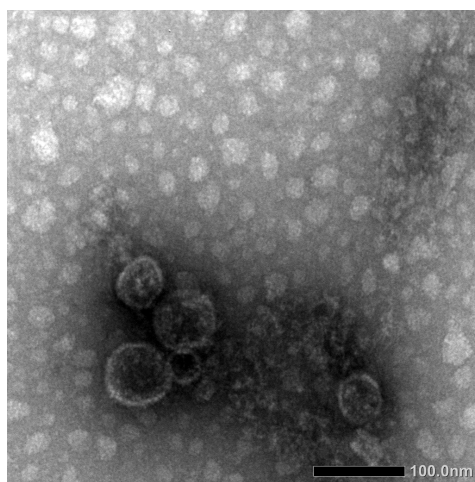


Рис. 4. Електронно-мікроскопічне зображення вірусоподібних часток у соку інфікованих рослин-індикаторів *C. amaranticolor* (бар 100 нм).

Fig. 4. Electron micrograph of virus-like particles in the sap of infected test-plants *C. amaranticolor* (bar 100 nm).

Висновки

Таким чином, проведено обстеження орхідних *O. picta*, відібраних в Чорноморському біосферному заповіднику. Доведена інфекційність соку даних рослин, а також можливість механічної передачі патогенів. Методом трансмісійної електронної мікроскопії у зразках рослин виявлені сферичні вірусоподібні частки діаметром близько 50 нм та 80-100 нм. Відповідно до морфологічних особливостей віруси, виділені з рослин *O. picta*, можуть належати до родини *Caulimoviridae* та роду *Tospovirus*. Виявлені патогени *O. picta* остаточно не ідентифіковані, їх дослідження продовжується.

References

- BRUNT A.A., CRABTREE K., DALLWITZ M.J., GIBBS A.J., WATSON L. and ZURCHER E.J. (eds.) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.
- CHEREVCHENKO T.M. (1993). *Tropicheskie i subtropicheskie orkhidei*. Kyiv: Naukova dumka. 253 p. [ЧЕРЕВЧЕНКО Т.М. (1993) *Тропические и субтропические орхидеи*. Киев: Наукова думка. 253с.]

- CHERVONA Knyha Ukrainy. Roslynni svit (2009). / Za red. Ya.P. Didukha. K.: Hlobalkonsaltnh. 900 p. [ЧЕРВОНА КНИГА України. Рослинний світ (2009). / За ред. Я.П. Дідуха. К.: Глобалконсалтинг. 900 с.]
- GNUTOVA R.V. (1993). Serologia i immunokhimia virusov rastenii. M.: Nauka. 301 p. [ГНУТОВА Р.В. (1993). Серология и иммунохимия вирусів рослин. М.: Наука. 301 с.]
- JENSEN D.D.(1950). Mosaic of Cymbidium orchid. Phytopathology. 40: 966-967.
- KOROTUYEVA G.V., POLISCHUK V.P. (2004). *Mikrobiol. zhurn.*, **66** (2): 74-80. [КОРОТЄЄВА Г. В., ПОЛІЩУК В.П. (2004). Віруси зозулинцевих природної флори України. *Мікробіол. журн.*, **66** (2): 74-80]
- LESEMANN D.E., VETTEN H.J. (1985). The occurrence of tobacco rattle and turnip mosaic virus in *Orchis ssp.*, and of an unidentified potyvirus of *Cypripedium calceolus*. *Acta Hortic*, **64**: 45-54.
- NAVALINSKIENĖ M., SAMUITIENĖ M. (2006). Dekoratyvinių augalų virusinės ligos ir jų sukėlėjai Lietuvoje. Kaunas:Lutute. 256 p.
- PAPPU H.R., JONES R.A.C., JAIN R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus Research*, **141**: 219-213.
- VIRUS TAXONOMY: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J (2012). NewYork: Elsevier Academic Press.: 1338 p.
- ZETTLER F.W., WISTLER G.C., ELLIOT M.S., KO N.-J. (1990). Viruses of orchids and their control. *Plant. Disease*, **74**: 621-626.
- ZHENG Y.-X., JAN F.-J. (2011). Identification and characterization of new *Phalaenopsis* orchid-infecting viruses. In W.-H. Chen and H.-H. Chen (eds): *Orchid Biotechnology II*. World Scientific Publishing, Singapore: 309-328.

Рекомендує до друку
О.Є. Ходосовцев

Отримано 26.12.2013

Адреса авторів:

О.С. Перегудова
Г.В. Коротєєва
Т.А. Компанець
В.П. Поліщук
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка
вул. Володимирська, 64/13
Київ, 01601
Україна
e-mail: ksandra_pereg@ukr.net

Authors' address:

A.S. Peregudova
G.V. Korotyeyeva
T.A. Kompanets
V.P. Polischuk
National Taras Shevchenko University of Kyiv
64/13, Volodymirska st.
Kyiv, 01601
Ukraine
e-mail: ksandra_pereg@ukr.net