

Выявление вирусов в растениях женьшеня, произрастающих в Украине

Л. А. Максименко, Н. И. Пархоменко, Е. Г. Жук¹, Л. Ф. Диденко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

¹ Лесоопытная станция УНАУ
г. Боярка, Киевская область

Растения женьшеня (Panax ginseng), культивируемые на Боярской лесопытной станции, в значительной степени поражены вирусами. Выделены нитевидные вирусы длиной 700–1000 нм. Установлено, что вирус табачной мозаики (ВТМ) и вирус огуречной мозаики (ВОМ) вызывают патологию женьшеня. Показано, что ВОМ способен передаваться через семена.

Введение. Вирусные болезни растений распространены во всех регионах. Одним из самых малоизученных объектов по способности поражаться фитовирусами является женьшень.

В 1968 г. в Дальневосточном центре АН СССР обнаружили вирусоподобные структуры, вызывающие перистую мозаику женьшеня. Исследования влияния мозаики на продуктивность женьшеня показали, что заболевание снижает общую урожайность корней до 25 %, уменьшает массу семян на 35 % и ухудшает качество рассады. Однако авторы не идентифицировали выявленные структуры [1].

В связи с промышленными масштабами выращивания женьшеня на плантациях следует обратить внимание на возможность поражения женьшеня вирусами и изыскать средства оздоровления ценного лекарственного сырья от вирусных заболеваний.

Материалы и методы. Для выделения вирусов листья женьшеня с симптомами заболевания освобождали от жилок, измельчали и растирали в жидком азоте. Затем к гомогенату прибавляли три объема буфера (0,05 М Na-фосфат, pH 8,0), содержащего 0,1 %-й меркаптоэтанол и 0,002 М ЭДТА. После полного разморозания гомогенат фильтровали и эмульгировали фильтрат с 1/7 объема хлорофор-

ма в течение 15 мин. Смесь центрифугировали при 10000 об/мин на протяжении 15 мин. К надсадку добавляли тритон X-100 до конечной концентрации 0,5 % и инкубировали на холоду в течение 30 мин. Затем центрифугировали на центрифуге УЦП-75 при 30000 об/мин (90 мин). Осадок вируса суспендировали на протяжении ночи в минимальном объеме 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,0. Вирусную суспензию центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Для дальнейшей очистки вирусный препарат фракционировали в градиенте концентрации (30–50 %) CsCl.

На градиент наносили 0,5 мл вирусной суспензии и центрифугировали при 40000 об/мин в течение 4 ч при температуре 4 °С в роторе SW-55 центрифуги «Beckman» (США). Распределившиеся фракции вирусов отбирали шприцем, исследовали спектр поглощения вирусов на спектрофотометре «Spcord» (ФРГ) и использовали их для анализа методом электронной микроскопии. Анализируемую суспензию вируса наносили на сеточки, покрытые коллодиевой пленкой, закрепленной углеродом. Затем исследуемый материал фиксировали 4 %-м нейтральным формальдегидом или 6 %-м глутаральдегидом, споласкивали и окрашивали. Для негативного контрастирования препарат окрашивали 2 %-м водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты в течение 30 с.

Для получения позитивного контраста исполь-

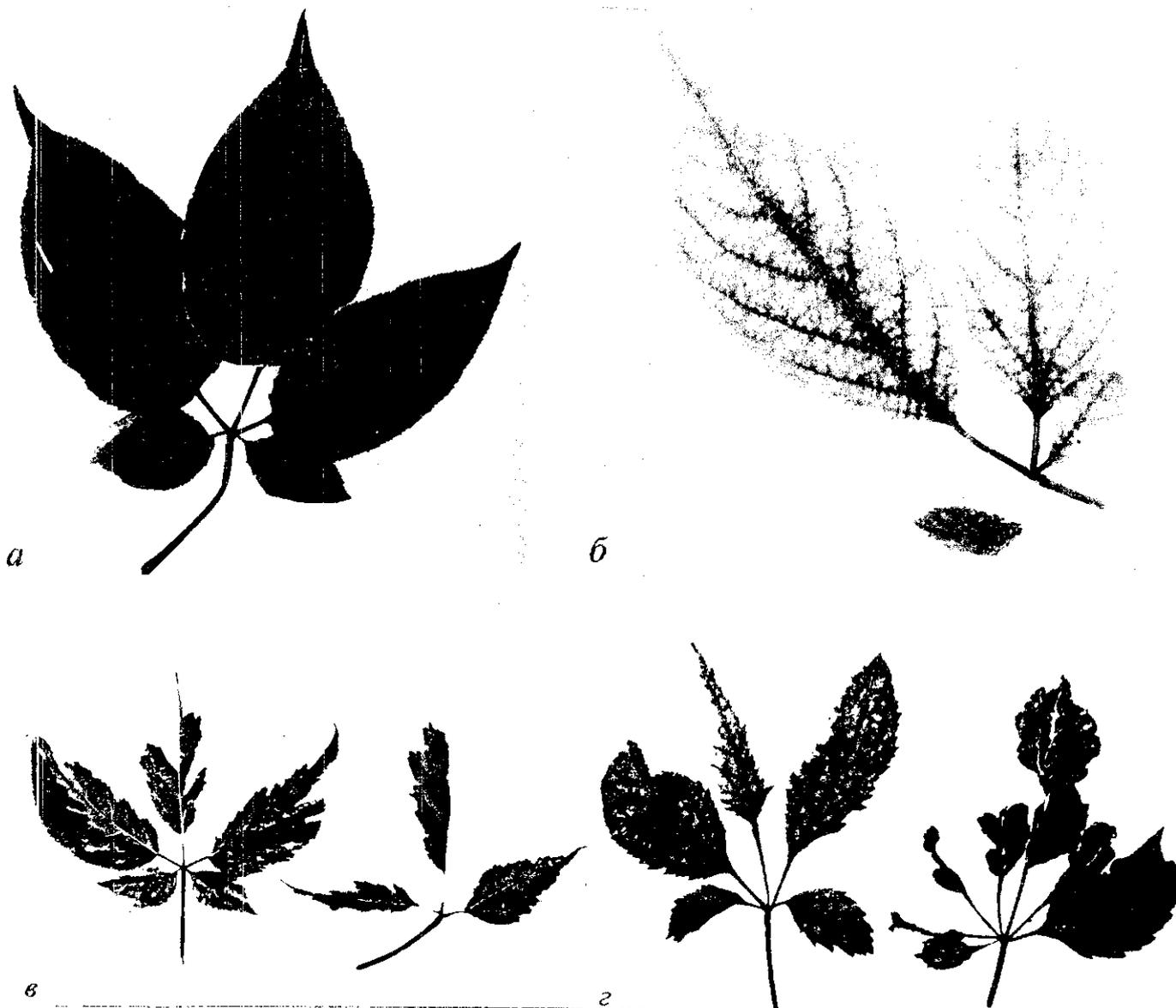


Рис 1. Листья женьшеня: а — здоровые; б — пораженные вирусами с симптомами мозаики; в — с белой пятнистостью, индуцируемой вирусной инфекцией; г — с деформацией, вызываемой вирусной патологией

зовали 2 %-й водный раствор уранилацетата или 2 %-й раствор уранилацетата в 30° спирте.

Окрашенный и высушенный препарат исследовали с помощью электронного микроскопа JEM-7 при инструментальном увеличении 17000—20000 [2]. Кроме этого, использовали метод напыления [3]: каплю взвеси вируса наносили на пленку-подложку, выдерживали в течение 3—5 мин для адсорбции вируса и подсушивали фильтровальной

бумагой. После полного высыхания препараты напыляли металлом (хромом) и просматривали в электронном микроскопе.

Сыворотку к очищенному вирусному препарату женьшеня получали методом, описанным Шепард и Шелла [4].

Титр сыворотки определяли методом двойной иммунодиффузии в агаре, как в работе [5]. Полученную поливалентную сыворотку использовали

для постановки иммунологических реакций по [5] для обнаружения вирусов в листьях, корнях и семенах женьшеня.

Исследуемые образцы листьев и корней растирали в плашках, добавляли по 200 мкл фосфатного буфера (0,05 М, рН 7,2) и 100 мкл диссоциирующего буфера, содержащего 2 % DS-Na и 5 % 2-меркаптоэтанола. Плашку накрывали крышкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Для определения содержания вируса в семенах, их растирали в ступке с фосфатным (0,05 М, рН 7,0) буфером, содержащим 0,2 % твин-20, и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Вирусы выявляли методом двойной иммунодиффузии в 1 %-м агаре.

Результаты и обсуждение. На плантациях Борской лесной опытной станции выявлены растения женьшеня с ярко выраженными симптомами заболевания (рис. 1), проявляющимися в виде мозаики, белой пятнистости (обычно вызываемой вирусами, индуцирующими мутацию хлоропластов), деформации листьев. По мере развития заболевания патология проявлялась в образовании некрозов, что характерно для вирусной инфекции. Кроме того, на больных растениях наблюдалось большое количество недоразвитых семян.

В результате электронно-микроскопических исследований в соке больных растений обнаружены различные по морфологии вирусные частицы. Очищенные препараты вируса обладали типичным нуклеопротеидным спектром поглощения с максимумом при 260 и минимумом при 240 нм. Соотношения $E_{260}/E_{280}=1,6$ и $E_{260}/E_{240}=1,3$.

Методом электронной микроскопии в очищенных вирусных препаратах выявлены нитевидные размером 700—1000 нм и изометрические вирусные частицы с диаметром около 30 нм (рис. 2).

К очищенному вирусному препарату из пораженного женьшеня с симптомами заболевания мозаики и деформации листьев получены поливалентные сыворотки, необходимые для выявления вирусов, патогенных для женьшеня. Кроме того, иммунологические исследования нужны также для изучения распространения вируса по растению и выяснения путей передачи вируса. С использованием сыворотки, полученной нами к вирусному препарату из листьев женьшеня, проведены исследования корней, листьев и семян больных растений женьшеня методом двойной иммунодиффузии в геле.

В результате серологических тестов установлено, что около 25,5 % исследуемого числа однолетних корней содержали вирусы. Практически все листья с ярко выраженными симптомами заболевания и семена из этих же растений содержали вирусы (рис. 3).

При использовании сывороток, полученных к вирусным изолятам из больных растений с симптомами мозаики и деформации листьев, установлено, что антитела к вирусам, вызывающим соответствующие симптомы заболевания, обнаруживаются в обеих сыворотках. Поскольку для обнаружения вирусов использовали поливалентную сыворотку, т. е. полученную к смеси вирусов, поражающих женьшень, нам предстояло идентифицировать эти вирусы.

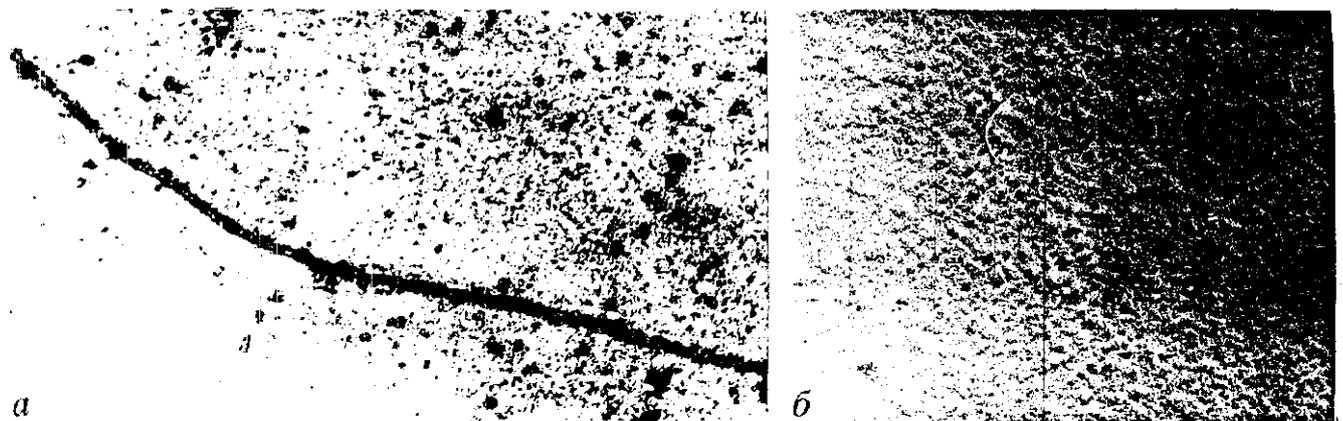
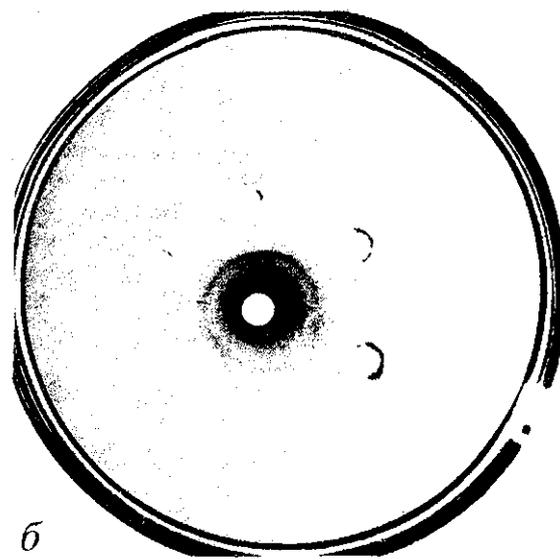
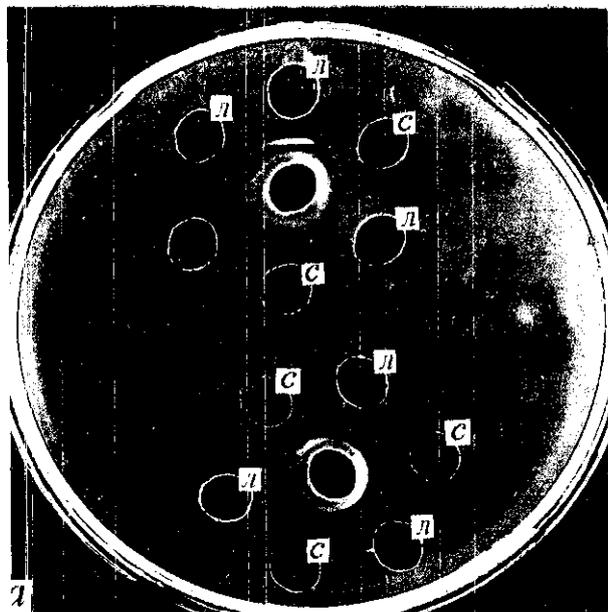


Рис. 2. Нитевидные (а) и изометрические (б) вирусные частицы из листьев женьшеня (X 20000)



с. 3. Реакция двойной иммунодиффузии в геле: а — листьев и семян женьшеня (л, с); б — корней-однолеток с сывороткой к вирусам женьшеня



с. 4. Реакция двойной иммунодиффузии в геле сока из листьев женьшеня с сывороткой к ВТМ

Как уже отмечалось, в вирусном препарате отсутствовали нитевидные вирусные частицы, по морфологии сходные с вирусами группы кластер, ги и потекс. Для идентификации вирусов была использована высокочувствительная иммуноферментная система к вирусу желтухи сахарной свек-

лы (представитель группы кластер) и вирусу мозаики сахарной свеклы (представитель группы поти), разработанная сотрудником Среднеазиатского института фитопатологии В. В. Роговым [6]. При обследовании иммуноферментным анализом 80 корней-однолеток и листьев женьшеня не удалось обнаружить вышеупомянутых вирусов. Отрицательный результат получен и в случае применения иммуноферментной системы к X-вирусу картофеля (группа потекс). Мы располагаем некоторыми физико-химическими характеристиками относительно нитевидных вирусов, но для окончательной их идентификации необходимо провести дополнительные исследования.

Методом электронной микроскопии в соке больных растений, кроме нитевидных вирионов, обнаружены палочковидные частицы, аналогичные по морфологии ВТМ. При использовании сыворотки ВТМ, полученной из Украинского НИИ с.-х. микробиологии, в листьях больных растений женьшеня обнаружен ВТМ (рис. 4).

Для идентификации изометрических вирусов использовали сыворотку к ВОМ, полученную на кафедре вирусологии МГУ. В результате проведенных иммунохимических реакций установилось, что обнаруженные сферические вирусные частицы диа-

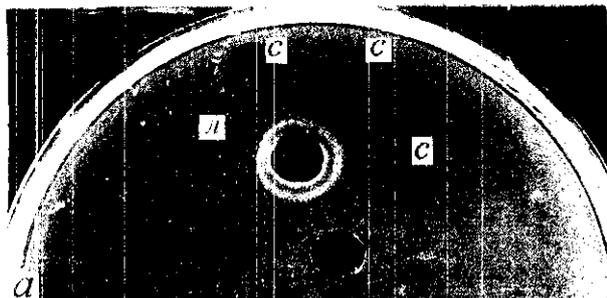


Рис. 5. Реакция двойной иммунодиффузии в геле: а — сока листьев (л) и экстракта семян (с) женьшеня с сывороткой к вирусу огуречной мозаики (ВОМ); б — очищенного вируса из листьев женьшеня с сывороткой к ВОМ

мером около 30 нм в листьях и семенах больных растений женьшеня соответствуют ВОМ-1 (рис. 5). Таким образом, выявлен один из путей распространения вируса ВОМ-1, патогенного для женьшеня, — через семена.

Представляло интерес также выявление растений — резервуаров вирусов, произрастающих вблизи плантации женьшеня. Так, были обследованы растения жимолости и элеутерококка, на листьях которых обнаружены симптомы, характерные для вирусных заболеваний.

Методом двойной иммунодиффузии в 1 %-м агаре с помощью различных антител, полученных к X-, Y-, M- и S-вирусам картофеля, а также сывороток к ВОМ и ВТМ, в листьях жимолости обнаружены вышеупомянутые вирусы картофеля, а также ВОМ и ВТМ. В листьях элеутерококка этим же методом выявлены вирусы ВОМ.

Таким образом, следует обратить особое внимание на растения — резервуары многих фитовирусов, в конкретном случае таковым является жимолость, которую нежелательно высаживать рядом с плантацией женьшеня.

Учитывая необходимость выращивания здоровых растений для получения лекарственного сырья, профилактика распространения заболевания может заключаться в выбраковке больных растений с помощью сывороток, полученных к вирусам, патогенным для женьшеня.

В результате проведенных исследований установлено, что растения женьшеня *Panax ginseng*, культивируемые на Боярской лесопытной станции, поражены вирусами. Выделены нитевидные вирусы размером 700—1000 нм. Показано, что ВТМ и ВОМ вызывают патологические изменения женьшеня. Установлен факт передачи ВОМ через семена женьшеня.

Л. О. Максименко, Н. І. Пархоменко, С. Г. Жук, Л. Ф. Діденко

Выявления вирусов у растениях женьшеню, що ростуть в Україні

Резюме

Рослини женьшеню (*Panax ginseng*), що вирощуються на Боярській лісодослідній станції, в значній мірі уражені вірусами. Виділено ниткоподібні віруси довжиною 700—1000 нм. Встановлено, що вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) і вірус огірчкової мозаїки (ВОМ) викликають патологію женьшеню. Показано, що ВОМ здатний передаватися через насіння.

L. A. Maximenko, N. I. Parkhomenko, E. G. Zhook, L. F. Didenko

Virus discovery in *Panax* plants growing in Ukraine

Summary

The plants of ginseng (*Panax ginseng*), cultivated at Bojarka forest experimental station are seriously affected by viruses. The thread type 700—1000 nm viruses were extracted. It was established that the tobacco mosaic virus (TMV) and cucumber mosaic virus (CMV) arouse ginsengs pathology. It was proved that CMV may be transferred through seeds.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крылов А. В., Рейфман В. Г., Степаненко В. И., Чуян Л. Л. Перистая мозаика — вирусоподобное заболевание женьшеня // VI Всесоюз. совещ. по вирус. болезням растений (3—7 мая 1971 г.): Тез. докл. — Владивосток, 1971. — Ч. 2. — С. 279—281.
2. Сатарова Н. А. Методы выделения и электронно микроскопического исследования рибосом // Клетка и клеточ. структуры. — М.: Наука, 1968. — С. 93—101.
3. Horne R. W., Harnden J. M., Hall R. The *in vitro* crystalline formations of Turnip Rosette Virus // Virology. — 1977. — 82. — P. 150—162.
4. Shepard J. F., Shalla T. A. An antigen analysis of potato virus X and of its degraded protein. 1. Evidence for and degree of antigenic disparity // Ibid. — 1970. — 42, N 4. — P. 825—834.
5. Ouchterlony O. In Handbook immunodiffusion and immunoelectrophoresis. — Michigan: Ann. Arbor. Sci. Publ., 1968. — P. 37.
6. Рогов В. В. Изучение свойств вирусов сахарной свеклы и разработка методов их иммунодиагностики: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Киев, 1991. — 19 с.

Поступила в редакцию 29.10.97