

## Kermėkus (*Limonium* Mill.) pažeidžiančių virusinių ligų sukėlėjai

Marija Samuitienė, Meletėlė Navalinskienė

Botanikos institutas, Žaliųjų Ežerų g. 49, LT-08406 Vilnius  
Tel. (8-5) 2729838, el. paštas [marija.samuitiene@botanika.lt](mailto:marija.samuitiene@botanika.lt)

Iš virusinėms ligoms būdingus požymius turinčių plačialapio kermėko (*Limonium latifolium* (Sm.) Kuntze) augalų buvo išskirti ir identifikuoti pomidorų žiediškosios dėmėtligės (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) ir pomidorų dėmėtojo vytulio (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) virusai. Virusai buvo identifikuoti augalų indikatorių, elektroninės mikroskopijos ir DAS–ELISA metodais. Abu virusai plačiai paplitę, pažeidžia daugelio genčių augalus, tarp jų ir dekoratyvinius. Aprašyti virusinių ligų sukėlėjų plitimo kontrolės būdai.

**Reikšminiai žodžiai:** *Limonium*, virusai, identifikavimas.

*Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) have been isolated from *Limonium latifolium* (Sm.) Kuntze plants expressing symptoms typical for viral diseases. Viruses have been identified by the methods of test-plants, electron microscopy and DAS-ELISA. Both viruses are distributed worldwide, have a wide host range including ornamental species. Means to control spreading of agents of viral diseases are described.

**Key words:** *Limonium*, viruses, identification.

### Įvadas

Pastaraisiais metais didelis dėmesys skiriamas lauko gėlininkystės plėtrai Lietuvoje. Nedidelių ūkių savininkams tai yra perspektyvus verslas. Augintojai augina daugiamečių dekoratyvinių augalų sodmenis ne tik Lietuvos, bet ir kaimyninių šalių rinkoms. Kaip ir kitos žemės ūkio kultūros, taip ir dekoratyviniai augalai yra pažeidžiami ligų, grybinių, bakterinių, virusinių. Ypač kenksmingos augalams yra virusinės ligos, kurios slopina augalų augimą, menkina dekoratyvumą, susilpnina augalo atsparumą kitoms ligoms ir sukelia augalo žuvimą. Daugiamečiuose augaluose virusinė infekcija kaupiasi, išsilaiko ir plinta į kitus augalus. Virusų plitimui palankus ir tradicinis vegetatyvinis šių augalų dauginimo būdas. Virusai yra viduląsteliniai patogenai, todėl tiesioginių priemonių juos kontroliuoti nėra, galimos tik profilaktinės priemonės. Norint užkirsti kelią ligoms plisti būtina nuolatinė monitoringo pobūdžio virusologinė kontrolė. Botanikos instituto Fitovirusų laboratorijos darbuotojai tikrina dekoratyvinių augalų, auginamų botanikos sodų kolekcijose, virusologinę būklę ir renka mėginius virusinių ligų sukėlėjams identifikuoti ir tirti. Kermėkų Lietuvoje dar nėra auginama labai daug, bet jie tampa vis populiariesni dėl puikiai tinkančių sausoms puokštėms ir floristinėms kompozicijoms žiedynų. Tikrinimo metu buvo rasta kermėkų, turinčių virusinio pažeidimo pobūdžio požymių. Kermėkai yra plumbaginių (*Plumbaginaceae* Juss.) šeimos *Limonium* Mill. genties vienamečiai, dvimečiai ir daugiamečiai dekoratyviniai augalai. Gentyje yra žinoma per 150 rūšių. Natūraliai auga druskingose jūros pakrančių ir dykumų zonose, daugiausia Viduržemio jūros, Centrinės Azijos, Kanarų salų regionuose (Cheifetz et al., 2004). Lietuvoje auginami kelių rūšių kermėkai, populiariausi plačialapis (*L. latifolium* (Sm.) Kuntze) ir karpytalapis (*L. sinuatum* (L.) Mill.) kermėkai.

Literatūroje aprašyti keli virusai, išskirti iš *L. sinuatum* Vokietijoje: turnepso mozaikos (*Turnip mosaic virus*), agurkų mozaikos (*Cucumber mosaic virus*), pupų vytulio (*Broad bean wilt virus*) (Niblet et al., 1969; Hein et al., 1976; 1977). Vėliau buvo išskirtas dar vienas virusas *Potyvirus* genties virusas, autorių pavadintas kermėkų virusu Y (*Statice virus Y*) (Lesemann et al., 1979).

Šio darbo tikslas – identifikuoti kermėkus pažeidžiančių virusinių ligų sukėlėjus.

## Tyrimų medžiaga ir metodai

Medžiaga surinkta Lietuvos sodininkystės ir daržininkystės instituto dekoratyvinių augalų kolekcijose 2005–2008 m. Eksperimentinis darbas atliktas Botanikos instituto Fitovirusų laboratorijoje.

Virusai identifikuoti augalų indikatorių, elektroninės mikroskopijos (EM), imunofermentinės analizės (DAS–ELISA) metodais.

Augalai indikatoriai virusams identifikuoti parinkti pagal literatūroje pateikiamus virusų aprašus (Ie, 1970; Stace-Smith, 1984; Brunt et al., 1996). Darbe naudoti augalai indikatoriai surašyti 1 lentelėje kartu su rezultatais. Jauni augalai indikatoriai (4–5 lapelių augimo tarpsnyje) užkrėsti mechaninės sulčių inokuliacijos būdu, ląstelių pažeidimui naudojant abrazyvinę medžiagą karborundą. Inokuliumas ruošiamas sutrinant tiriamųjų augalų lapus 0,1 M fosfatiniame buferyje pH 7,2 su virusus stabilizuojančiais priedais: 0,2 % 2–merkptoetanolio arba 0,01 M natrio dietilditiokarbamato (Dijkstra, de Jager; 1998).

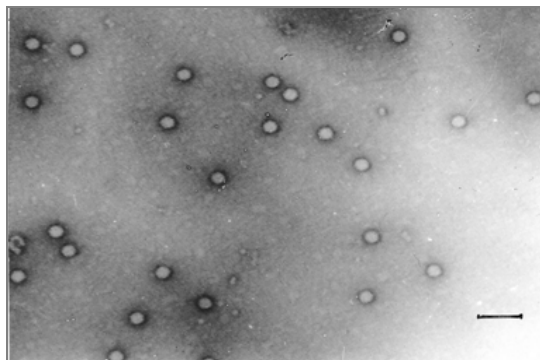
Virusų dalelėms aptikti ir jų morfologijai nustatyti iš natūraliai užsikrėtusių ir eksperimentiškai virusais užkrėstų lapų paruoštuose preparatuose naudojome peršviečiamąjį elektroninį mikroskopą JEM 100S; instrumentinis didinimas 25000x. Preparatai ruošiami negatyvaus kontrastavimo būdu, tiriamąją medžiagą kontrastuojant 3 % uranilacetato tirpalu (Dijkstra, de Jager, 1998).

Imunofermentinis DAS–ELISA testas atliktas remiantis M. F. Clark, A. N. Adams (1977) metodu. Teste buvo panaudoti specifiniai ToRSV ir TSWV komerciniai (DSMZ Plant Virus Collection, Germany) imunoglobulinai (IgG) ir jų konjugatai su šarmine fosfataze; darbas atliekamas laikantis gamintojo protokolo. Kaip antigenai buvo naudojamos tiriamųjų augalų arba užkrėstų augalų indikatorių sultys, neigiama kontrolė – sveiko augalo sultys. Absorbcija matuojama esant 405 nm bangos ilgiui (Labsystem Multiscan RT). Reakcija yra vertinama kaip teigiama, kai tiriamojo mėginio absorbcijos reikšmė du ir daugiau kartų viršija neigiamos kontrolės absorbcijos reikšmę.

## Rezultatai ir jų aptarimas

*Pomidorų žiediškosios dėmėligės virusas (Tomato ringspot virus, ToRSV)* buvo išskirtas iš pažeistų plačialapio kermėko augalų, kurių lapai buvo šiek tiek deformuoti, ant jų buvo išryškėjusios stambios chlorotinės žiediškosios dėmės (sp. foto, 20 pav.). Vėliau dėmės patamsėja, nekrotizuojasi.

Virusas buvo identifikuotas užkrėtus augalus indikatorius. ToRSV būdingi vietinės ir sisteminės reakcijos požymiai pasirodė ant *Celosia argentea*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*, *Lycopersicon esculentum* ir kt. augalų indikatorių (1 lentelė). EM preparatuose buvo rasta izometrinių 30 nm skersmens viruso dalelių (1 pav.).



**1 pav.** ToRSV dalelių elektronografija. Brūkšnys – 100 nm  
**Fig. 1.** Electron micrograph of ToRSV particles. Bar represents 100 nm

Buvo atliktas viruso infekcijos patikrinimas atlikus DAS-ELISA testą. Gauta teigiama reakcija tiek su natūraliai užsikrėtusiais augalais, tiek ir užkrėstais augalais indikatoriais patvirtino ToRSV infekciją plačialapio kermėko augaluose.

**1 lentelė.** Augalų indikatorių požymiai užkrėtus iš plačialapių kermėkų išskirtais virusais  
**Table 1.** Symptoms of test-plants inoculated with viruses isolated from *Limonium latifolium*

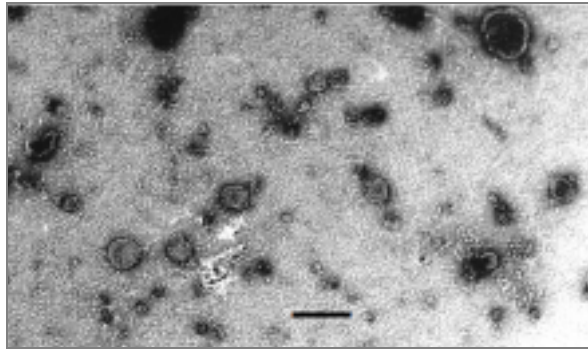
Augalas indikatorius/Test-plant	Virusai ir jų požymiai/Viruses and their symptoms	
	ToRSV	TSWV
<i>Amaranthaceae</i> Juss.		
<i>Amaranthus caudatus</i> L.	L: NLL; S: Sp,Dis	
<i>A. paniculatus</i> L.	L: NSp; S: Sp,LeDis	L: CILL, S:RiSp
<i>Celosia argentea</i> L.	L: DBrRi; S: VCl,LeDis,BrSp,Ln	
<i>Gomphrena globosa</i> L.	L: NSp; S: Dis,Mo	
<i>Chenopodiaceae</i> Vent.		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn	L: CILL; S: Vstu,TR,NT	L:SmCILL
<i>C. murale</i> L.	L: ClSp; S: VCl,Mo,N,LeDis	
<i>C. urbicum</i> L.	L: ClSp; S: VCl,LeDis	
<i>C. quinoa</i> Willd.	L: ClSp,N,Dis; S: Cl,N,LeDis,ApN	L:SmCILL
<i>Cucurbitaceae</i> Juss.		
<i>Cucumis sativus</i> L.	L: N arba CILL; S: Mo	L:CotClSp,N
<i>Solanaceae</i> Juss.		
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	L: NSp; S: Mo,N	L:CINSp; S:MiCINSp
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	L: NSp	L: NLL; S:Npat,LeDis
<i>N. rustica</i> L.	L: NriSp	L:CINRiSp; S:
<i>N. tabacum</i> L.	L: NSp; S: NSp,Str	L:RiNSp; S:NV,RiSp,LeDis
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	L: GNRI; S: LeDis,ClSp,NSp	L:NBrLL
<i>Physalis floridana</i> Rybd.	L: NLL,LeRu	
<i>Fabaceae</i> Lindl.		
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.		L:NSp; S:RiSp
<i>Aizoaceae</i> J.G. Agardh		
<i>Tetragonia expansa</i> Murr.	L: DifClSp; S: LeDis,ClDot	
<i>Tropaeolaceae</i> Juss. ex DC.		
<i>Tropaeolum majus</i> L.		S:Cl ir NSp

**Paaiškinimai/ abbreviations:** L – vietiniai/local; S – sisteminiai/systemic; Ap – augimo kūgelis/apex; Br – rudas/brown; C – pašviesėjimas/clearing; Cl – chlorotinis/chlorotic; Cot – cotyleadons/skilčialapiai; D – tamsus/dark; Dif – difuzinis/diffuse; Dis – deformacija/distortion; Dot – taškai/dots; Fl – žiedas/flower; G – pilkas/grey; Gr – žalias/green; Y – geltonas/yellow; LL – vietiniai pažeidimai/local lesions; Le – lapas/leaf; Li – šviesus/light; Ln – linijos/lines; M – mozaika/mosaic; Mi – silpnas/mild; Mo – margumas/mottling; Mrb – marmuriškas/marble; Pat – raštas/pattern; N – nekrotinis, nekrozė/necrotic, necrosis; R – užsisukimas/rolling; Ri – žiedai/rings; RiSp – žiediškosios dėmės/ringspot; Ru – raukšlėtumas, garbanė/rugosity; Sm – mažas/small; Sp – dėmės/spots; Str – dryžiai/streaks; Stu – žemaūgė/stunting; T – viršūnė/top; V – gyslos/veins.

ToRSV yra *Nepovirus* genties atstovas sukeliantis daugelio rūšių augalų ekonomiškai svarbias ligas. Pirmą kartą išskirtas iš pomidorų ir aprašytas 1936 m. Virusas turi izometrines 30 nm skersmens daleles. Lengvai perduodamas mechanine sulčių inokuliacija, natūraliai užkrečia labai daug augalų šeimininkų, tiek sumedėjusių, tiek ir žolinių. Virusą platina *Xiphinema* genties nematodai. Yra duomenų apie perdavimą per kai kurių augalų sėklą. Daugelis augalų tuoj po užsikrėtimo įgauna ryškius ir labai įvairius požymius. Vėliau sergantys augalai paprastai ryškių požymių neberodo, tik sumažėja augalų produktyvumas (Stace–Smith, 1984; Brunt et al., 1996). ToRSV išskirtas iš dekoratyvinių augalų: hortenzijų, kardelių, narcizų, pelargonijų, petunijų, plukių ir vilkdalgių (Loebenstein et al., 1995). Lietuvoje ToRSV identifikuotas 39 genčių dekoratyviniuose augaluose (Navalinskienė, Samuitienė, 2006).

*Pomidorų dėmėtojo vytulio virusas (Tomato spotted wilt virus)* buvo išskirtas iš plačialapio kermėko, rodančio ryškius virusinio pažeidimo požymius. Ant pažeistų augalų lapų atsiranda šviesiai žalių su gelsvu atspalviu vingiuotų juostų bei žiediškujų dėmių, jos išsidėsčiusios arčiau lapo viršūnės ir pakraščiuose (sp. foto, 21 pav.). Lapams senstant, šios juostos ir dėmės įgauna rausvą atspalvį. Lapalakštis deformuojasi.

Virusas buvo identifikuotas užkrėtus augalus indikatorius. Vietinius požymius parodė užkrėsti augalai indikatoriai: *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Petunia hybrida*; vietinė ir sisteminė reakcija išryškėjo ant *Amaranthus paniculatus*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris* ir *Nicotiana* genties indikatorių. *Tropaeolum majus* rodė tik sisteminę reakciją (1 lentelė). Tokia augalų indikatorių reakcija yra būdinga TSWV (Ie, 1970; Brunt et al., 1996). EM preparatuose, paruoštuose tiek iš natūraliai užsikrėtusių kermėkų, tiek ir iš užkrėtų augalų indikatorių buvo rasta netaisyklingos formos 85–110 nm skersmens izometrinių dalelių su apvaskalėliu, būdingų *Tospovirus* genties virusams (2 pav.). DAS-ELISA teste gauta teigiama reakcija patvirtino TSWV infekciją kermėkuose ir užkrėstuose augaluose indikatoriuose.



**2 pav.** TSWV dalelių elektronmikrografija. Brūkšnys – 100 nm  
**Fig. 2.** Electron micrograph of TSWV particles. Bar represents 100 nm

TSWV yra *Tospovirus* genties tipinis virusas. Pirmą kartą užregistruotas Australijoje 1915 metais ir aprašytas australų mokslininkų G. Samuel, J. G. Bald, H. A. Puttman 1930 metais (Ie, 1970). Virusas labai labilus ir greit inaktyvuojasi *in vitro*. Virusų dalelės izometrinės, netaisyklingos formos, 85–110 nm skersmens, su lipidiniu apvaskalėliu. Virusą persistentiškai platina *Thrips tabaci*, *Franklinella* sp. genties tripsai, jų organizme virusas praeina inkubacinį periodą. Persiduoda mechaniškai sulčių inokuliacija, tačiau sunkiai (Brunt et al., 1996). Augalų šeimininkų spektras platus, virusas pažeidžia per 500 rūšių augalų iš 50 šeimų ir paplitęs visame pasaulyje. Literatūroje aprašytas 24 rūšių dekoratyviniuose augaluose (Loebenstein et al., 1995). Lietuvoje buvo išskirtas ir identifikuotas iš 19 genčių dekoratyvinių augalų (Navalinskienė, Samuitienė, 2006).

Dekoratyviniai augalai paprastai dauginami vegetatyviškai, todėl jei dauginamas augalas yra užsikrėtęs virusine liga, virusas pakliūna į visus naujai padaugintus augalus. Gėlynuose ir botanikos sodų kolekcijose augalai daugelį metų yra auginami toje pačioje vietoje, kur aplinka ir dirvožemis gali būti stipriai užsikrėtę virusus pernešančiais vabzdžiais, dirvožemio grybais ar nematodais. Svarbiausios virusinių ligų kontrolės priemonės yra sveikų augalų auginimas ir dauginimas, nuolatinė fitosanitarinė priežiūra, šalinant pažeistus augalus potencialius infekcijos židinius, pernešėjų naikinimas. Nematodų pernešamų virusų plitimo riziką galima sumažinti dezinfekuoju dirvožemį chemikalais, naikinančiais nematodus. Virusinių ligų pavojus mažinamas pritaikant kultūrų sėjomainą, laikantis kiekvienos rūšies augalams tinkamos agrotechnikos, nes stipresni augalai yra atsparesni infekcijoms. Labai svarbi ligų kontrolės kryptis yra virusams atsparių augalų veislių kūrimas. Augalai gali būti devirusuojami ir padauginami pritaikius termoterapijos ir meristemų kultūros metodą (Murant, 1981; Spiegel, Loebenstein, 1995).

## Išvados

1. Pomidorų žiediškosios dėmėtligės virusas (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) buvo išskirtas iš pažeistų plačialapio kermėko augalų, kurių lapai buvo šiek tiek deformuoti, ant jų buvo išryškėjusios stambios chlorotinės žiediškosios dėmės. Virusas identifikuotas užkrėtus augalus indikatorius, ant kurių išryškėjo ToRSV būdingos reakcijos, pagal EM nustatytą dalelių morfologiją (izometrinės 30 nm skersmens dalelės) ir teigiamą reakciją DAS-ELISA teste.
2. Pomidorų dėmėtojo vytulio virusas (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) buvo išskirtas iš pažeistų plačialapio kermėko augalų su lapalakščio deformacijos, ryškių vingiuotų juostų bei žiediškujų dėmių ant lapų viršūnių ir pakraščių simptomais. Virusas identifikuotas užkrėtus augalus indikatorius, kurie parodė TSWV būdingus požymius, pagal EM nustatytą dalelių morfologiją (izometrinės netaisyklingos formos 85–110 nm skersmens dalelės su apvalkalėliu) ir teigiamą reakciją DAS-ELISA teste.

## Literatūra

1. Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L. Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Cambridge, 1996
2. Cheifetz A., Double C., Barnard L., Imwold D. (eds.). Annuals and Perennials. Sydney, 2004
3. Clark M. F., Adams A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, Vol. 34, 1977. P. 475–483
4. Dijkstra J., de Jager C. P. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Berlin, 1998
5. Hein A., Koenig R., Lesemann D. E., Querfurth G. Kohlschwarzringfleckingkeits-Virus und Gurkenmosaic-Virus in Stative-Kulturen in Suddeutschland. *Z. Pflanzenkrankh., Pflanzenschutz*, Vol. 83, 1976. P. 229–233
6. Hein A., Lesemann D. E., Querfurth G. Das-Broad-bean wilt-Virus in Limonium-kulturen in Suddeutschland. *Phytopath. Z.*, Vol. 89, 1977. P. 340–346
7. Ie T. S. Tomato spotted wilt virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 39, 1970. P. 1–4
8. Lesemann D.-E., Koenig R., Hein A. Stative Virus Y – a virus related to Bean yellow mosaic and Clover yellow vein viruses. *Phytopath. Z.*, Vol. 95, 1979. P. 128–139
9. Loebenstein G., Lawson R. H., Brunt A. A. (eds). Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops., Jeruzalem, 1995
10. Murrant A. F. Nepoviruses. In: E. Kurstak (ed.) Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Amsterdam, New York, Oxford, 1981. P. 197–238
11. Navalinskienė M., Samuitienė M. Dekoratyvinių augalų virusinės ligos ir jų sukėlėjai Lietuvoje. Kaunas, 2006
12. Niblett C. L., Paulus A. O., Semančik J. S. A mosaic disease of statice caused by turnip mosaic virus. *Phytopathology*, Vol. 59, 1979. P. 1166–1167
13. Spiegel S., Loebenstein G. Control of virus diseases. In: Loebenstein G., Lawson R.H., Brunt A. A. (eds). Virus and Virus-like Diseases of Bulb and Flower Crops. Jeruzalem, 1995. P. 203–218
14. Stace-Smith R. Tomato ringspot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No. 290, 1984. P. 1–6

## The Agents of Viral Diseases Affecting *Limonium* Mill. Plants

### Summary

*Limonium latifolium* (Sm.) Kuntze plants showing symptoms of viral disease expressed by leaf distortion, yellow sinuous bands and ring spots on leaves have been collected at ornamental plant collection of Institute of Horticulture. Two viruses, *Tomato ringspot virus* (ToRSV) and *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) have been isolated from diseased plants and identified using the methods of test-plants, electron microscopy (EM) and DAS-ELISA. For ToRSV identification 16 test-plant species belonging to families of *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* and *Solanaceae* have been inoculated by mechanical sap inoculation. Virus induced local and systemic reaction on test-plants, specific for ToRSV. EM revealed isometric particles 30 nm in diameter. Such morphology of particles is specific for ToRSV. DAS-ELISA test confirmed ToRSV infection in diseased host plants and inoculated test-plants. ToRSV is a member of *Nepovirus* genus, has a wide host range, including many species of ornamentals. It is transmitted by the nematodes of *Xiphinema* sp. For TSWV identification 11 test-plant species from named above families including specific for this virus test-plant *Tropaeolum majus* (*Tropaeolaceae*) have been inoculated. Virus induced local reaction

in *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Cucumis sativus*, *Petunia hybrida*; local and systemic reaction in *Amaranthus paniculatus*, *Lycopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris* and in species of the genus *Nicotiana*. *Tropaeolum majus* developed systemic symptoms. Such type of reaction on test-plants is specific for TSWV. EM revealed irregular form enveloped isometric particles, 85-110 nm in diameter, specific morphology of the members of *Tospovirus* genus. Positive reaction in DAS-ELISA test confirmed TSWV infection in *Limonium latifolium* and inoculated test-plants. TSWV is a type member of *Tospovirus* genus. It is distributed worldwide; transmitted in a persistent manner by a vector, *Thrips tabaci*, *Franklinella* sp. thrips.

Means to control spreading of agents of viral diseases are described.