

УДК 578.863.1:57.083.223:631.8:632.38

ОСОБЛИВОСТІ РОЗВИТКУ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ, СПРИЧИНЕНОЇ *POTATO VIRUS M*, НА РОСЛИНАХ КАРТОПЛІ ЗА ДІЇ МІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ

І. Г. Будзанівська¹, Т. О. Бова², О. О. Кучерявенко²,
О. В. Пиріг², О. О. Дмитрук²

¹Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології»
просп. Глушкова, 2; м. Київ, 03187, Україна; e-mail: decanat_bf@univ.kiev.ua

²Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН
вул. Шевченка, 97; м. Чернігів, 14027, Україна; e-mail: altrockman@mail.ru

Досліджено особливості розвитку вірусної інфекції, спричиненої Potato virus M, на рослинах картоплі за дії мікробних препаратів. Застосування біопрепаратів Біограну та Бактопасльону за умов штучного інфікування МВК сприяло збільшенню висоти уражених рослин та сумарного вмісту хлорофілу відносно контролю, зниженню концентрації вірусу в рослинах та активності ферменту рибонуклеази в інфікованих МВК рослинах картоплі.

Ключові слова: картопля, вірусна інфекція, рибонуклеаза, мікробні препарати.

Вірусні хвороби є причиною виродження сортів картоплі, і саме вони є об'єктом найпильнішої уваги картоплярів у багатьох країнах [1]. Репродукція вірусу в рослині спричиняє суттєві фізіологічні зміни і функціональні розлади (порушення обміну білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів, фотосинтезу, дихання, транспірації і водообміну тощо) [2].

М-вірус картоплі (МВК, *Potato virus M*, рід *Carlavirus*, родина *Betaflexiviridae*) є одним із найбільш розповсюджених патогенів картоплі в усіх зонах вирощування цієї культури. Втрати врожаю від М-вірусної інфекції можуть сягати 41 %. За багаторічними даними співробітників лабораторії вірусології Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН (ІСМАВ НААН), МВК виявляється як у моноінфекції, так і в комплексі з іншими мозаїчними вірусами. Крім того, у 20–70 % виявлено безсимптомний перебіг вірусного захворювання. Тобто, вже при вирощуванні насінневого матеріалу складаються передумови економічних збитків у галузі картоплярства [3; 4]. Тому пошук шляхів зниження втрат від

вірусних інфекцій на посадках картоплі сьогодні є актуальним.

Застосування фізіологічно активних речовин, здатних стимулювати природні захисні механізми рослин, розцінюють як перспективну стратегію захисту від вірусних інфекцій. Мікробні препарати, створені для покращення азотного і фосфорного живлення рослин, відрізняються комплексним позитивним впливом на рослини і безпечністю для навколишнього середовища та є однією зі складових сучасних технологій вирощування сільськогосподарських культур [5].

Слід відмітити, що серед сільськогосподарських культур, для яких розроблено бактеріальні препарати, дещо осторонь знаходиться картопля. Дослідження з інокуляції картоплі не настільки системні та масштабні, як для багатьох інших культур, в Україні цьому питанню також не приділяється належної уваги [6].

Картоплю відносять до культур із досить слабо розвиненою кореневою системою [6; 7]. Це дає підстави для твердження, що бактеризація може відігравати особливу роль у

технології вирощування цієї культури, адже, впливаючи на перебіг мікробіологічних процесів у ризосфері рослини, можна поліпшити забезпечення її елементами живлення, що, в свою чергу, стимулюватиме позитивні зміни у рості й розвитку рослин, формуванні врожаю, а також забезпечить поліпшення якості одержуваної продукції [7].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження особливостей розвитку вірусної інфекції, спричиненої *Potato virus M*, на рослинах картоплі за дії мікробних препаратів.

Матеріали й методи. У дослідженнях використовували колекційний штам МВК, який виділено з рослин картоплі сорту Нагорода в лабораторії вірусології ІСМАВ НААН. Накопичення вірусу проводили на рослинах *Lycopersicon esculentum* Mill., які заражали у фазу 3–4 справжніх листків методом механічної інокуляції [8; 9]. Через 21 день після інфікування рослини томатів перевіряли на наявність МВК методами електронної мікроскопії [10] та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [11].

У роботі використовували рослини *in vitro* картоплі сорту Жуковський ранній, які висаджували у стерильний ґрунт. Вологість ґрунту впродовж вегетаційного періоду підтримували на рівні 60 % від повної вологоємності.

Обробку кореневої системи рослин картоплі проводили у день висаджування. У препаратах Біогран і Бактопасльон замочували кореневу систему з розрахунку 1 : 10 та 1 : 100 відповідно. Контрольні зразки обробляли водою. Повторність досліду 15-разова.

Через 14 діб після висаджування меристемної картоплі в ґрунт частину рослин інфікували М-вірусом картоплі. Наявність вірусу в дослідних зразках рослин картоплі контролювали на 21-й день від ураження МВК за використання електронної мікроскопії [10] та імуноферментного аналізу (ІФА) [12]. Як контролю використовували здорові рослини тютюну (негативний контроль) та уражені МВК (позитивний контроль).

Визначення РНКазної активності проводили на 22-й день після зараження за методикою А. К. Chakravorty в модифікації Ю. И. Власова [13].

Наважку 1 г свіжого рослинного матеріалу розтирали з 15 мл 0,06 М фосфатного

буферу, рН 6,7. Розтирання проводили на льоду із застосуванням кварцового піску. Потім рослинну масу віджимали крізь 2 шари марлі. Отриманий екстракт центрифугували при 10 000 g упродовж 25 хв. Осад відкидали, а супернатант негайно підкислювали 1 Н соляною кислотою до рН 5,0 та залишали на ніч при 0 °С. Випадав осад, від якого звільнялися шляхом центрифугування при 4000 g упродовж 25 хв., а прозорий розчин використовували для визначення активності РНКаз. Для цього ферментну витяжку доводили до 20 мл фосфатним буфером.

Досліджувані проби, які склалися з 0,7 мл ферментної витяжки, 1 мл фосфатного буфера рН 5,0 та 0,3 мл субстрату (стандартний розчин — дріжджова РНК, 10 мг/мл) інкубували у центрифужних пробірках в термостаті при 37 °С упродовж 75 хв. Процедуру з виготовлення реакційної суміші проводили на льодяній бані. Після інкубації в реакційну суміш додавали 2 мл осаджувача (суміш 50 мл 96 %-го етилового спирту з 1,7 мл 57 %-ї HClO_4). Ця операція також проводилася на льоду. До кожної досліджуваної проби готували контрольні. У контрольних пробах для припинення реакції осаджувач додавали раніше, ніж ферментну витяжку.

Проби після інкубування негайно переносили на льодяну баню та витримували у холоді впродовж 2 годин для повного випадання осаду. Потім проводили центрифугування при 3000 g упродовж 30 хв. Отриманий супернатант доводили до 10 мл фосфатним буфером та спектрофотометрували при 260 нм.

Результати та їх обговорення. Після інокуляції рослин томатів МВК на 21-й день спостерігали симптоми вірусної інфекції у вигляді скручування верхівкових листків. За використання електронної мікроскопії у вірусних препаратах, одержаних із хворих рослин томатів, спостерігали скупчення ниткоподібних часточок довжиною 651–661 нм, 12–15 нм у діаметрі, морфологія яких була типовою для карлавірусів (рис. 1).

Дослідженнями з використанням методу ПЛР також підтверджено присутність МВК у рослинному матеріалі. В агарозному гелі довжина пробігу продукту полімеразної реакції аналізованого зразка співпадала із позитивним контролем МВК, а його розмір становив 300 пар нуклеотидів (рис. 2).



Рис. 1. Електроннографія МВК (інструментальне збільшення $\times 20\ 000$).

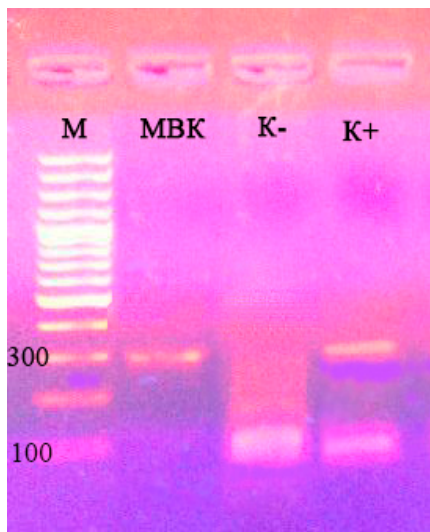


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР при визначенні М-вірусу картоплі: М — маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів), МВК — аналізований зразок, К- — негативний контроль, К+ — позитивний контроль.

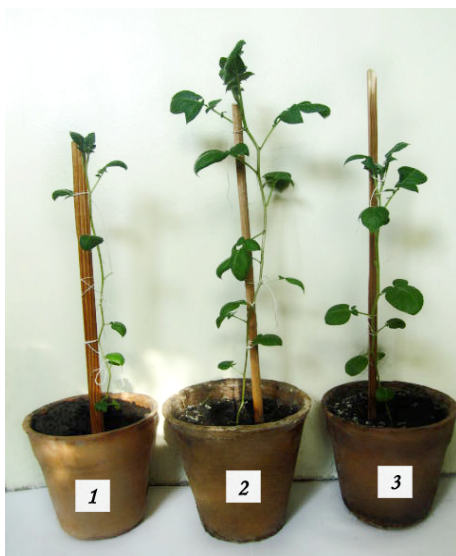
Для вивчення впливу вірусної інфекції на ріст і розвиток рослин картоплі за дії біопрепаратів пробіркові рослини картоплі адаптували до умов *in vivo* впродовж 14 діб, після чого половину рослин інфікували одержаним вірусним препаратом МВК.

На 21-й день на п'яти рослинах із контрольної групи, не оброблених мікробними препаратами, з'явилися симптоми вірусної інфекції у вигляді закручування листків, які мали темно-зелене забарвлення. Крім того, уражені рослини значно відставали у рості, висота уражених рослин зменшувалася на 18,0 % по відношенню до здорових (рис. 3).

Передсадивна інокуляція рослин Біограном та Бактопасльоном сприяла збільшенню висоти уражених рослин на 15,5 % та 6,0 % відповідно при показниках контролю (уражені рослини без інокуляції) 31,8 см (рис. 4).

Відомо, що розвиток вірусного патогенезу пов'язаний зі зміною структури і функцій фотосинтетичного апарату рослин. Однією з причин зниження вмісту хлорофілу при вірусній інфекції є руйнування хлоропластів у клітинах уражених рослин [14].

При вивченні впливу вірусної інфекції на фотосинтетичний апарат рослин картоплі встановлено зниження сумарного вмісту хлорофілу в листках уражених рослин на 12,0 % порівняно зі здоровими (табл. 1). Найбільший приріст суми хлорофілів *a* і *b* порівняно з контролем спостерігали за використання Біограну — 14,0 %. За дії Бактопасльону сумарний вміст хлорофілу становив 130,9 мг на 100 г, що на 3,3 % більше, ніж у контролі.



а



б

Рис. 3. Висота рослин картоплі за дії біопрепаратів: а — здорові рослини, б — рослини, уражені МВК; 1 — контроль (без бактеризації), 2 — Біогран, 3 — Бактопасльон.

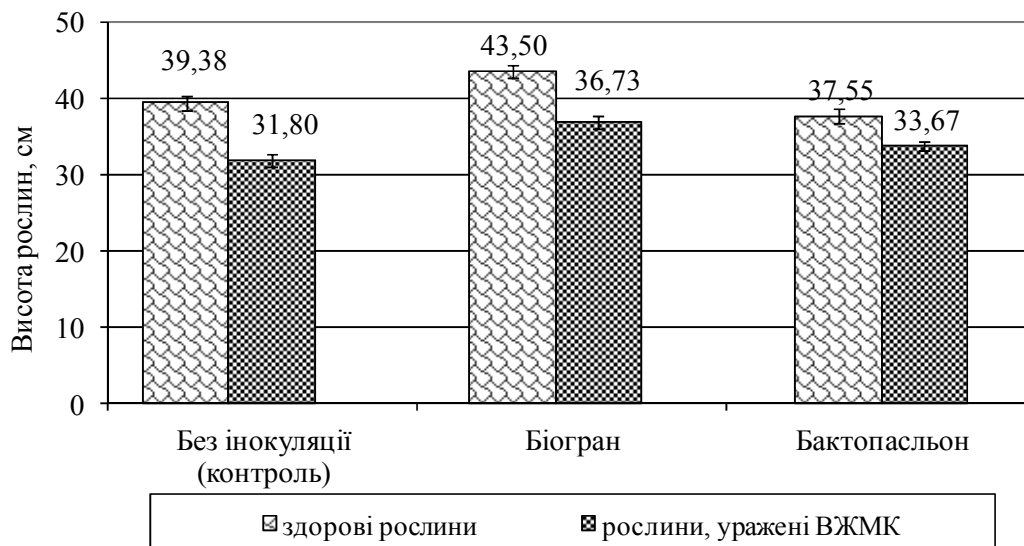


Рис. 4. Вплив біопрепаратів на ріст здорових та уражених МВК рослин картоплі.

Таблиця 1. Вплив мікробних препаратів на вміст хлорофілу в листках здорових та уражених МВК рослин картоплі, мг на 100 г

Варіанти дослідів	Хлорофіл <i>a</i>	Хлорофіл <i>b</i>	Сума хлорофілів <i>a+b</i>
здорові рослини			
Контроль	97,4±0,4	44,6±1,0	142,0±0,6
Біогран	102,8±1,0	61,8±2,2	164,6±1,2
Бактопасльон	106,9±0,9	50,6±1,5	157,5±0,6
уражені рослини			
Контроль	93,3±0,7	33,4±1,4	126,7±0,7
Біогран	96,0±0,8	48,5±0,9	144,5±0,1
Бактопасльон	87,2±1,9	43,7±2,2	130,9±2,8

Проведення імуноферментного аналізу дозволило виявити зниження концентрації вірусу в рослинах за інокуляції біопрепаратами (табл. 2). Так, оптична густина зразка варіанту з рослинами, інокульованими Біограном та ураженими МВК, становила 0,76 оптичних одиниць, що на 24,7 % нижче за цей показник у варіанті без бактеризації. При дослідженні зразків рослин, інокульованих Бактопасльоном та уражених МВК, спостерігали зменшення вірусного навантаження на 15 % порівняно з контролем, оптична густина при цьому становила 0,86 оптичних одиниць. Тобто, за дії біопрепаратів спостерігається зниження інтенсивності репродукції вірусу у рослинах картоплі.

Відомо, що рибонуклеази відіграють важливу роль у захисних реакціях клітин рослин при проникненні вірусу [15; 16], тому визначали активність цього ферменту при

максимальній концентрації вірусу у рослинах картоплі.

Активність РНКаз у здорових рослин по варіантах майже не відрізнялася і перебувала у межах похибки дослідження (рис. 5). Найвищі показники активності РНКаз спостерігали у заражених рослин без обробки мікробними препаратами (122,0 Е). За використання Біограну та Бактопасльону активність ферменту знижувалася на 35,0 Е та 23,0 Е відповідно порівняно з контролем, що пояснюється зниженням концентрації вірусу у цих варіантах.

Таким чином, біопрепарати Біогран та Бактопасльон сприяли покращенню фізіологічного стану рослин картоплі сорту Жуковський ранній при штучному ураженні МВК. Застосування біопрепаратів сприяло збільшенню висоти уражених рослин по відношенню до контролю на 6,0–15,5 %; сумарно-

Таблиця 2. Концентрація вірусу МВК в рослинах картоплі сорту Жуковський ранній, визначена методом ІФА

Варіанти досліду	Концентрація М-вірусу (оптична густина, од.)	Різниця до контролю, %
Рослини, інокульовані Біограном та уражені МВК	0,76±0,02	24,7
Рослини, інокульовані Бактопасльоном та уражені МВК	0,86±0,01	15,0
Контроль (рослини, уражені МВК, без бактеризації)	1,01±0,02	—
Негативний контроль «←» (інтактні рослини тютюну без обробки біопрепаратами)	0,11±0,02	—
Позитивний контроль «+» (рослини тютюну, уражені МВК без обробки біопрепаратами)	1,17±0,01	—

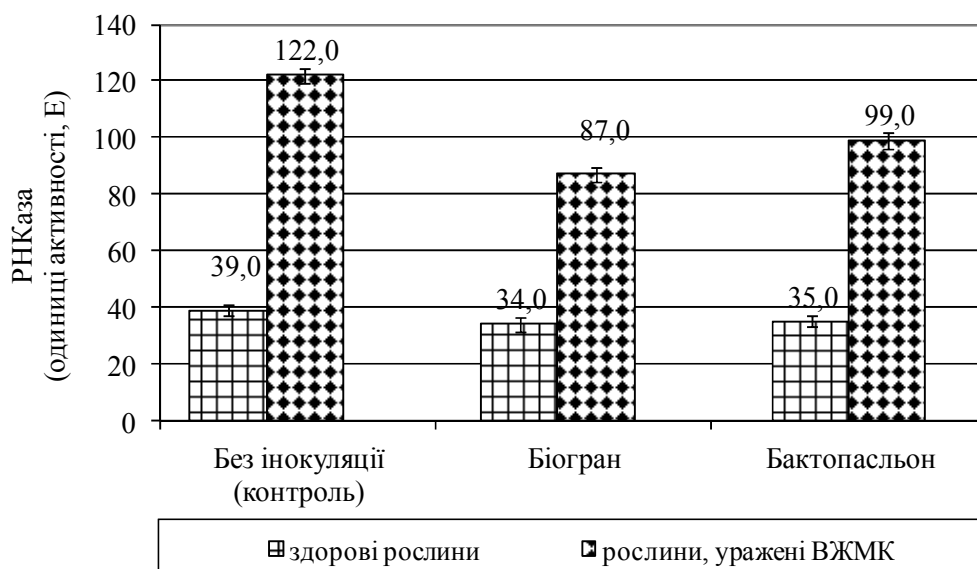


Рис. 5. Вплив біопрепаратів на активність РНКазу в листках здорових та уражених МВК рослин картоплі.

го вмісту хлорофілу — на 14,0 % та 3,3 % відповідно. За дії біопрепаратів відмічено зниження концентрації М-вірусу картоплі у рослинах і, як наслідок, зниження активності рибонуклеази.

1. Коломієць Л. П. Вірусні хвороби картоплі / Коломієць Л. П. // Чернігівщина аграрна. — 2007. — № 2(6). — С. 7–9.

2. Блоцкая Ж. В. Вирусные болезни картофеля / Ж. В. Блоцкая. — Минск : Наука і техника, 1993. — 222 с.

3. Моніторингові дослідження вірусних хвороб на посадках картоплі Полісся України / [Дмитрук О. О., Дмитрук Ю. О., Бова Т. О. та ін.] // Сільськогосподарська мікробіологія. — Чернігів : ЦНП, 2012. — № 15–16. — С. 140–149.

4. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навч. посіб. / М. Д. Мельничук, А. Л. Бойко, В. П. Патица. — К. : Поліграф Консалтинг, 2005. — 200 с.

5. Волкогон В. В. Мікробіологи пропонують змінити стратегію удобрення сільгоспкультур / Волкогон В. В. // Пропозиція. — 2009. — № 6. — С. 50–52.

6. Дімова С. Б. Використання нового біологічного препарату комплексної дії біограну як засобу оптимізації продукційного процесу рослин картоплі : дис. ... канд. с.-г. наук : 03.00.07 / Дімова Світлана Борисівна. — Чернігів, 2008. — 203 с.

7. Картопля : монографія / за ред. Кононченка В. В., Молоцького М. Я. — К. : Біла Церква, 2002. — Т. 1. — 536 с.

8. Гутникова З. И. Растения-индикаторы ви-

русов растений / З. И. Гутникова, А. В. Крылов. — Владивосток : Биол.-почв. институт, 1980. — 222 с.

9. Kado C. I. Mechanical and biological inoculation principles / C. I. Kado, H. O. Agriwal // Principles and techniques in plant virology. — New York : van Nostran-Reinhold, 1972. — P. 4–31.

10. Развязкина Г. М. Упрощенный метод обнаружения в электронном микроскопе вирусных частиц из сока растений / Развязкина Г. М., Полякова Г. П., Штейн-Марголина В. А. // Вопр. вирусол. — 1968. — № 5. — С. 633–934.

11. Полімеразна ланцюгова реакція в лабораторній діагностиці інфекційних хвороб : навч.-метод. посіб. для лікарів / за ред. Дзюблик І. В., Горовенко Н. Г. — К., 2012. — 219 с.

12. Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусных растений / Р. В. Гнутова. — М. : Наука,

1993. — 301 с.

13. Власов Ю. И. Биохимический метод оценки патогенности штаммов вируса табачной мозаики на томатах : метод. указ. — Л. — Пушкин, 1981. — 6 с.

14. Бужоряну В. В. Ультраструктура вирусных включений в растительных клетках. Атлас / В. В. Бужоряну, М. Я. Молдован. — Кишинев : Штиинца, 1982. — 168 с.

15. Эффективная экспрессия гена экстраклеточной рибонуклеазы *Zinnia elegans* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 / [Сангаев С. С., Трифонова Е. А., Титов С. Е. и др.] // Генетика. — 2007. — Т. 43. — С. 1002–1005.

16. Ильинская О. Н. Рибонуклеазы как противовирусные агенты / О. Н. Ильинская, Р. Шах Махмуд // Молекулярная биология. — 2014. — Т. 48, № 5. — С. 707–717.

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ *POTATO VIRUS M* ПОД ДЕЙСТВИЕМ МИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РАСТЕНИЯХ КАРТОФЕЛЯ

И. Г. Будзановская¹, Т. А. Бова²,
О. А. Кучерявенко², А. В. Пирог²,
О. А. Дмитрук²

¹Киевский национальный университет им. Тараса Шевченко, УНЦ «Институт биологии», г. Киев

²Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

Исследованы особенности развития вирусной инфекции, вызванной Potato virus M, при обработке микробными препаратами на растениях картофеля. Применение биопрепаратов Биогра и Бактопаслена в условиях искусственного инфицирования МВК способствовало повышению высоты растений, зараженных вирусом, увеличению суммарного содержания хлорофилла по отношению к контролю, снижению концентрации вируса в растениях и активности фермента рибонуклеазы в растениях картофеля, зараженных МВК.

Ключевые слова: картофель, вирусная инфекция, рибонуклеаза, микробные препараты.

CHARACTERISTICS OF VIRAL INFECTION DEVELOPMENT CAUSED BY *POTATO VIRUS M* UNDER THE IMPACT OF BIOPREPARATIONS ON POTATO PLANTS

I. G. Budzanivska¹, T. O. Bova²,
O. O. Kucheryavenko², O. V. Pyrih²,
O. O. Dmytruk²

¹ESC «Institute of Biology», Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv

²Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

The paper presents the results of developmental study of viral infection caused by Potato virus M under the impact of microbial preparations on potato plants. Use of biopreparations Biogran and Bactopaslen, at artificial plants infection with PVM had ensured development of higher plants infected with virus, increase of total chlorophyll content compared to control, decrease of virus concentration in plants and activity of ribonuclease enzyme in potato plants infected with PVM.

Key words: potato, viral infection, ribonuclease, microbial preparations.