

ШТАМОВЕ РІЗНОМАНІТТЯ ВІРУСУ ШАРКИ СЛИВИ В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ

*Шарка сливи (збудник *Plum rox virus*) — найнебезпечніше захворювання кісточкових культур. Хвороба викликає важкі втрати у сприйнятливих сортів сливи, персика, абрикоса, нектарина, черешні та інших кісточкових культур. Виявлено, що на території Одеської області циркулюють два штами вірусу шарки сливи PPV-M та PPV-D. Встановлено, що PPV-D уражує персик, сливу і аличу. Вперше в Одеській області виявлено PPV-M на черешні. Найбільш уражуваними культурами в області є персик та слива.*

кісточкові культури, вірус шарки сливи, штам, імуноферментний аналіз (ІФА), полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Шарка сливи (збудник *Plum rox virus* (PPV)) — найнебезпечніше захворювання кісточкових культур. Вперше зробив опис хвороби шарки сливи та опублікував його доктор Д. Атанасов. В своїй публікації він вказав, що захворювання було виявлене в Південно-Західному краї Болгарії приблизно наприкінці Першої світової війни на сливі *Kustendil* [7]. Спостереження за захворюванням в Болгарії проводилося приблизно в 1917—1918 рр. З тих пір вірус поступово поширився в усіх країнах Європи, Середземноморського басейну, на Близькому і Середньому Сході, а також у Північній і Південній Америці та в Азії [8].

Хвороба викликає важкі втрати у сприйнятливих сортів сливи, персика, абрикоса, нектарина та інших кісточкових культур. В результаті національних та міжнародних нормативних актів наявність збудника в області значно ускладнює вирощування, розведення і торгівлю саджанцями цих культур.

У багатьох країнах збитки, пов'язані з цим захворюванням, включають в себе втрати якісного врожаю, карантинні, ліквідаційні та компенсаційні заходи. Витрати на боротьбу з PPV у всьому світі, починаючи з 1970 року, перевищили 10 000 мільйонів євро [5, 8, 13].

С.В. ПАВЛОВА,
науковий співробітник,
Дослідна станція карантину винограду
і плодкових культур ІЗР НААН, Україна,
svpavl31@gmail.ru

О.В. СТАХУРСЬКА,
аспірант
кафедра вірусології, ННЦ «Інститут
біології та медицини»,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка, Україна;
virus@biocc.univ.kiev.ua

PPV генетично різноманітний. Виділяють 9 штамів вірусу [9], однак на сьогоднішній день деякі штами були виявлені тільки в одній країні (наприклад, штам *Cherry Russian* (CR) в Росії, штам *El Amag* (EA) в Єгипті і турецький штам (Т) в Туреччині. Ізоляти *Dideron* (D) штаму були знайдені в кожній країні, де виявлено PPV. Цілком можливо, що деякі PPV-D ізоляти можуть не бути агресивними і не завжди достовірно визначаються в рутинних діагностичних тестах [3].

PPV-D є одним з перших штамів, виявлених і підтверджених за допомогою молекулярних методів. Вперше його виявили на абрикосі в південно-східному регіоні Франції. Це один із найпоширеніших штамів PPV у всьому світі. Він був знайдений у понад 40 країнах, у тому числі в Північній і Південній Америці. За літературними даними ізоляти штаму D пов'язані з порівняно помірними симптомами хвороби та не ефективною передачею попелицями.

Штам PPV-M розповсюджений в основному в південній та центральній Європі (Албанії, Болгарії, Кіпрі, Чехії, Франції, Німеччині, Греції, Італії, Угорщині, Молдові, Румунії, Словаччині, Іспанії, Туреччині і в інших) на рослинах мигдалю, абрикоса, персика, сливи і вишні. Був вперше виявлений на персику в Греції [13]. Цей штам описується як більш агресивний, ніж штам D.

Predajna et al. [2012] з'ясували, що коли одне дерево сливи трічі заразили трьома ізолятами PPV M (*Marcus*), D та Rec (*Recombinant*), після 7 років був виявлений тільки M ізолят.

Визначення штамового різноманіття вірусу шарки сливи та хвороби шарки на території України є актуальним, зокрема в південному регіоні, де вирощування кісточкових плодкових культур зумовлене геокономічним розташуванням. На даному етапі такі дослідження необхідні для запобігання поширенню вірусу шарки сливи на території нашої країни, а в подальшому — і для виробництва високоякісного посадкового матеріалу, який задовольняв би потреби садівництва України.

Метою даної роботи є дослідження розповсюдження вірусу шарки сливи на півдні України, встановлення штамів ВШС, що циркулюють в Одеській області.

Матеріали та методи досліджень. Відповідно до діагностичного протоколу ЕОКЗР РМ 7/32(1) схема виявлення та ідентифікації вірусів кісточкових культур припускає застосування відбіркових скринінг-тестів і підтверджувальних аналізів [3].

Зразки відбирали як в промислових садах, так і в присадибних ділянках Біляївського, Овідіопольського, Татарбунарського, Саратовського, Кілійського та Ізмаїльського районів Одеської області з метою виявлення вірусу шарки сливи.

За наявності типових симптомів для лабораторного тестування відбирали листя, квітки або плоди з симптомами. На безсимптомних рослинах, залежно від часу проведення обстежень, для аналізів відбирали пагони, квітки, листя або незрілі плоди. Характер і ступінь розвитку симптомів шарки на листі і плодах є тим об'єктивним критерієм, що визначає сприйнятливість чи відносну стійкість кожного сорту.

Обстеження проводили через 21—28 днів після цвітіння та в період дозрівання плодів [3]. На великих

площах (до 20 га) — не менше 20% дерев; на ділянках, менших 3 га — 25—50% дерев; на присадибних ділянках — 100%.

Процент уражених дерев визначали шляхом прямого підрахунку кількості дерев з симптомами вірусу шарки в загальній кількості дерев на площі:

$$П = a/A \times 100\%,$$

де a — кількість уражених рослин; A — загальна кількість обстежених рослин [4].

Провідне місце серед методів діагностики та ідентифікації вірусу шарки сливи займають імуноферментний аналіз (ІФА) і різні варіанти полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією.

ІФА — це досить специфічний метод, базується на 5B-IVIA/AMR. За допомогою цього методу виявляють білкову оболонку вірусу. Тест-системи для діагностики PPV, засновані на застосуванні поліклональних антитіл до вірусу в сендвіч-варіанті. Найбільш надійним способом імунохімічної діагностики PPV вважається непрямий сендвіч-варіант ІФА з використанням моноклональних антитіл 5B до універсального епітопу 94DRDVDAG100, який до недавнього часу знаходили в білкових оболонках всіх досліджених в цьому відношенні ізолятів PPV.

В ЗТ-ПЛР будь-який ізолят PPV виявляється за допомогою пари універсальних праймерів, специфічних до гена білкової оболонки чи 3-NCR. При ампліфікації цих сегментів геному утворюються продукти розміром відповідно 243 і 220 п.н. Одним з найбільш чутливих методів детекції збудника шарки сливи вважається імуноспецифічна ЗТ-ПЛР.

У будь-якому дослідженні вірусу або ідентифікації штаму, де це можливо, повинні використовуватися кілька підходів, орієнтованих на множинні локуси для підтвердження ідентичності [9].

Результати та обговорення. Для виявлення уражених рослин застосовували візуальну діагностику за зовнішніми ознаками ураження листкових пластинок та плодів вегетуючих рослин. Зразки листя відбирали з характерними симптомами шарки (рис. 1): хлоротичні плями або кільця, деформація листків та просвітлини жилок, дрібні кільця або виразки на плодах, іноді з коричневим або червоним некрозом. Також, ознакою були розмиті при-

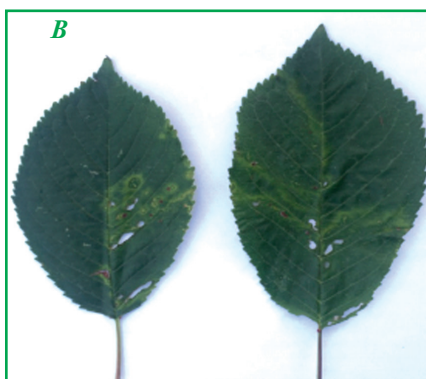


Рис. 1. Характерні симптоми шарки на листі сливи (А) та черешні (В)

жилкові плями або кільця по всій поверхні листкової пластинки, що мали світло-зелене або жовто-зелене забарвлення. Плями розташовувались впродовж жилок і по краях листкової пластинки, вони добре проглядались на світлі, в центрі плям тканини листка зберігали нормальний зелений колір.

Враховуючи погодні умови останніх років в Одеській області відбір зразків проводили з середини квітня до початку червня та з кінця серпня до середини вересня.

Візуальне спостереження зовнішніх симптомів ураження є досить ненадійним методом виявлення та діагностики вірусних інфекцій, оскільки прояв симптомів вірусного ураження залежить, головним чином, від взаємодії вірусу та рослини. Крім того, досить часто штами одного й того ж вірусу здатні викликати різні симптоми на рослинах одного виду, змінюючи при цьому зовнішні прояви від надчутливості до безсимптомного носійства вірусу. На прояв симптомів, крім того, впливають умови вирощування рослин і наявність супровідної інфекції, що є досить розповсюдженим явищем при вірусному ураженні кісточкових культур. Тому наявність вірусної інфекції має бути підтверджена специфічними методами діагностики

вірусних інфекцій та ідентифікації вірусів, зокрема за допомогою серологічних реакцій.

Для серологічної діагностики використовували імуноферментний аналіз („сендвіч” метод) в 96-лункових полістиролових планшетах із застосуванням специфічної сироватки до вірусу шарки сливи, оскільки однією з переваг цього методу є можливість використання неочищених вірусних препаратів для діагностики даного вірусу.

В результаті наших досліджень, проведених в 2015—2016 рр., на наявність вірусу шарки сливи було відібрано та проаналізовано методом ІФА 265 зразків сливи, персика, нектарину, черешні й аличі та виявлено низький рівень ураження рослин, що може бути пов'язано з низькою чутливістю методу. Встановлено, що серед кісточкових культур найбільш інфікованими виявилися персик та слива — відповідно 45,6 та 42,1% загальної кількості позитивних зразків, черешня — 8,3%, алича — 2,8%, нектарин — 1,2%.

В подальшому всі позитивні зразки були перевірені за допомогою молекулярного методу ЗТ-ПЛР. Нині використовуються різні підходи для діагностики ВШС методом ПЛР. Існують класичні праймери для постановки ЗТ-ПЛР (праймери Р1 та Р2) для детекції всіх штамів ВШС. Також використовується модифікація нестед — ПЛР для діагностики штамів М та Д вірусу шарки сливи. Високочутливе визначення вірусу методом ЗТ-ПЛР успішно використовується для виявлення вірусу шарки сливи в матеріалі за його високих негативних прогностичних значень [21], рекомендується при більш ніж 10% очікуваного поширення PPV. Поєднання обох методів досягає 100% точності в ідентифікації вірусу

PPV-D часто описують як неепідемічний штам, до того ж поширення вірусу відбувається повільно. Існують відмінності в ізолятах залежно від хазяїна та географічного положення [9]. Він уражує в першу чергу сливу, аличу, іноді персик [3].

Симптоми ураження PPV-M проявляються більш яскраво і набагато ефективніше передаються попелицями. Ізоляти штаму М серологічно і генетично відрізняються від ізолятів штаму D. Існують також серологічні розходження між ізолятами PPV-M. Описано два серологічно різних підкластера: М1 з

Середземноморського регіону, М2 із Східної/Центральної Європи. Генетичне різноманіття ізолятів штаму М є відносно низьким [9].

На першому етапі молекулярно-генетичної діагностики провели тотальне виділення РНК за допомогою кіта фірми Invitrogen. Наступним кроком була постановка ПЛР з використанням ЗТ полімерази. Для детекції всіх штамів ВШС застосували пару праймерів Р1 та Р2. Продукт розміром 231 по. При додаванні праймерів PD+P1 детектували штам D, при додаванні праймерів PM+P1 детектували штам М. Одержані продукти ампліфікації враховували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (рис. 2).

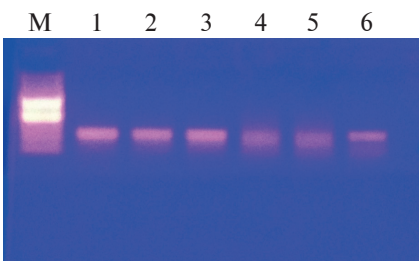


Рис. 2. Електрофорез продуктів ЗТ-ПЛР ВШС в агарозному гелі з праймерами: М — маркери (HyperLadder 1 (100 по)); 1—2 — зразки черешні (с. Хлібодарське); 3 — зразки нектарина (с. Дмитрівка); 4 — зразки персика (с. Мирне); 5 — зразок сливи (с. Дослідне); 6 — позитивний контроль

Отже, в результаті постановки ПЛР з використанням різних праймерів виявили та підтвердили ВШС на таких рослинах: слива, алича та персик, нектарин, черешня. Також виявили, що найбільш поширеним в досліджуваних регіонах є D штам, рідко зустрічається М штам. Наші дослідження показали, що в Одеській області штам PPV-D найбільш розповсюджений на персику та сливі. Слід, однак, відзначити, що насадження саме цих культур є максимально поширеними на території області і піддаються інтенсивним обстеженням.

Більше 8% знайдених в Одеській області ізолятів належать до штаму М. Важливо відзначити, що з усіх типів насаджень ізоляти цього штаму виявлені тільки в плодоносних садах черешні. Таким чином, в зразках черешні нами виявлено PPV-M вірусу шарки сливи за допомогою зворотньо-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції.

Вперше в Одеській області 2015 року було виявлено захворювання вірусом шарки сливи на черешні та 2016 року ідентифіковано штам вірусу PPV — М.

ВИСНОВКИ

На території Одеської області циркулюють два штами вірусу шарки сливи — PPV-M та PPV-D. Штам PPV-M уражує насадження черешні, а штам PPV-D — насадження сливи та персика. Найбільш ураженіми культурами в Одеській області є персик і слива.

ЛІТЕРАТУРА

1. Будзанівська І.Г., Поліщук В.П. Філогенетичний аналіз РНК-вмісних вірусів рослин, що циркулюють на території. — Ічня: ПП «Формат». — 2014. — 226 с.
2. Господарик А.В. Діагностика вірусів плодівих культур в умовах України / А.В. Господарик, К.М. Удовиченко, В.П. Поліщук // Наукові записки НАУКМА. — 2005 — т. 43. — С. 50—54.
3. Приходько Ю.Н., Магомедов У.Ш. Вирусы семечковых и косточковых плодовых культур. — Воронеж: НПЦ «Научная книга». — 2011. — 211—215.
4. Ратушняк Л.К. Діагностика шарки сливи в кісточкових садах / Л.К. Ратушняк // Карантин і захист рослин. — 2002. — № 48. — С. 199—207.
5. Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease // EPPO Bulletin. — 2006. — V. 36. — P. 202—204.
6. Scholthof K.-B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. D. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology // Mol. Plant Pathol. — 2011. — V. 12. — P. 938—954.
7. Atanasoff D. Plum pox. A new virus disease // Annu. Univ. Sofia. — 1933. — V. 9. — P. 49—70.
8. Barba M., Hadidi A., Candresse T., Cambra M. Plum pox virus. In: Hadidi A., Barba M., Candresse T., Jelkmann W. (eds) Virus and Virus-Like Diseases of Pome and Stone Fruits // APS Press., St. Paul., Minnesota, USA. — 2011. — P. 185—197.
9. James D., Varga A., Sanderson D. Genetic diversity of Plum pox virus: strains disease and related challenges for control // Can. J. Plant Pathol. — 2013. — V. 35. — P. 431—441.
10. Predajna L., Šubr Z., Candresse T., Glasa M. Evaluation of the genetic diversity of Plum pox virus in a single plum tree // Virus Res. — 2012. — V. 167. — P. 112—117.
11. Damsteegt V.D., Scorza R., Stone A.L., Schneider W.L., Webb K., Demuth M., Gildow F.E. Prunus host range of Plum pox virus (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation // Plant Dis. — 2007. — V. 91. — P. 18—23.
12. James D., Thompson D. Hosts and symptoms of Plum pox virus: ornamental and wild Prunus species // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 222—224.
13. Garsia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease // Molecular plant pathology. — 2014. — V. 15(3). — P. 226—241.
14. Llacer G. Hosts and symptoms of Plum

pox virus: herbaceous hosts // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 227—228.

15. Polák J. Hosts and symptoms of Plum pox virus: woody species other than fruit and ornamental species of Prunus // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 225—226.

16. Dallot S., Gottwald T., Labonne G., Quiot J.B. Spatial pattern analysis of sharka disease (Plum pox virus strain M) in peach orchards of southern France // Phytopathology. — 2003. — V. 93. — P. 1543—1552.

17. Gottwald T.R. Epidemiology of sharka disease in North America // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 279—286.

18. Labonne G., Dallot S. Epidemiology of sharka disease in France // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 267—270.

19. Pasquini G., Barba M. The question of seed transmissibility of Plum pox virus // EPPO Bull. — 2006. — V. 36. — P. 287—292.

20. Wetzel T., Candresse T., Ravelondro M., Dunez J. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection // J. Virol. Methods. — 1991. — V. 33. — P. 355—366.

21. Glasa M., Šubr Z. A simplified RT-PCR-Based detection of Rec PPV isolates. // Acta virologica 48: 2004. — P. 173—176.

**Павлова С.В.,
Стахурська О.В.**

Штаммовое разнообразие вируса шарки сливы в Одесской области

Шарка сливы (возбудитель Plum pox virus) — опасное заболевание косточковых культур. Болезнь вызывает большие потери у чувствительных сортов сливы, персика, нектарина, абрикоса, черешни, и алычи. Выявлено, что на территории Одесской области циркулируют два штамма вируса шарки сливы PPV-M и PPV-D. Установлено, что штамм PPV-D поражает персик, сливу, алычу. Впервые в Одесской области выявлен штамм PPV-M на черешне. Персик и слива — культуры, наиболее поражаемые шаркой в Одесской области.

косточковые культуры, вирус шарки сливы, штамм, иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Pavlova S., Stahurska O.

The strain variety of the plum shark virus in the Odessa region

Plum pox virus is the causal agent of sharka disease, one of the most harmful viral diseases of stone fruit cultures. The disease causes heavy losses in susceptible varieties of plum, peach, apricot, nectarine, sweet cherry and other stone fruit crops. Two strains of pox virus of plum were detected in Odessa region; they are PPV-M and PPV-D. It is determined that PPV-D damages plum, peach and cherry plums crops. PPV-M was first time detected on a sweet cherry. Peach and plum — the culture most affected by sharka in the Odessa region.

stone crops, PPV, enzyme-linked immunosorbent analysis (ELISA), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Рецензент:

Тимова Л.Г.,

кандидат біологічних наук

Дослідна станція карантину винограду і плодівих культур ІЗР НААН