

ДІАГНОСТИКА ВІРУСУ НЕКРОТИЧНОГО ПОЖОВТІННЯ ЖИЛОК БУРЯКА, ЩО ЦИРКУЛЮЄ В УКРАЇНІ

*К.В. Гринчук¹, І.О. Антіпов¹, А.М. Кириченко²,
Г.В. Краєва², А.Ф. Ліханов³*

¹Національний університет біоресурсів і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

³Інститут еволюційної екології НАН України,
вул. акад. Лебедева, 37, Київ, 03143, Україна
e-mail: kirangel.07@meta.ua

Мета. Встановлення наявності вірусу некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ) в агроценозах України та дослідження особливості його діагностування. **Методи.** Роботу виконано з використанням класичних вірусологічних та молекулярно-біологічних методів діагностики та ідентифікації вірусних патогенів, зокрема, електронної мікроскопії, методу рослин-індикаторів, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). ВНПЖБ було очищено та підтверджено інфекційну природу захворювання рослин цукрових буряків за тріадою Коха. Проведено гістохімічні дослідження реакції рослинних клітин на ураження вірусом. **Результати.** Апробовано ряд методів діагностики ВНПЖБ. Шляхом імунізації кроля очищеним вірусом отримано сироватки крові з високим вмістом антитіл до ВНПЖБ, які в подальшому можуть бути використані для серологічної діагностики даного збудника. Наявність ВНПЖБ також було підтверджено методом електронної мікроскопії та методом біологічного тестування вірусу. Встановлено, що у клітинах флоєми провідних пучків листків цукрових буряків, інфікованих ВНПЖБ, концентрація зв'язаних з клітинними стінками пероксидаз зменшується на фоні збільшення вільних ізоферментів у протопластах. Перерозподіл ізоферментів пероксидази у компартментах клітин супроводжується значним підвищенням їх активності. **Висновки.** В агроценозах Черкаської області цукрові буряки уражені вірусами некротичного пожовтіння жилок буряка та мозаїки буряка. Наявність змішаної інфекції в рослинах була підтверджена методом ПЛР. Симптоми, індуковані вірусом на рослинах-індикаторах, були типовими для ВНПЖБ. Показана можливість потенційної експрес-діагностики вірусу гістохімічним методом. Для своєчасного виявлення вірусу некротичного пожовтіння жилок буряка рекомендовано проводити тестування його наявності як в листках, так і в коренеплодах рослин цукрового буряка.

Ключові слова: вірус некротичного пожовтіння жилок буряка, вірус мозаїки буряка, ідентифікація ВНПЖБ, цукровий буряк, полімеразна ланцюгова реакція.

Цукрові буряки – це важлива сільськогосподарська культура, позаяк є джерелом понад 20% цукру, що виробляється в усьому світі [6]. Окрім того, цукрові буряки використовуються при згодовуванні тварин, харчуванні людини, як сировина для виробництва біопалива та фармацевтичної продукції. В останні роки відбувається помітне зростання ураженості цукрових буряків і зниження врожайності культури та якості коренеплодів,

спричинене інфікуванням їх низкою патогенів. До найбільш економічно значимих вірусів, що уражують цукрові буряки в усьому світі, належать *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), *Beet soil-borne mosaic virus* (BSBMV), *Beet soil-borne virus* (BSBV) та *Beet virus Q* (BVQ). В агро-системах України основними небезпечними для рослин буряка є вірусні інфекції, що спричиняють мозаїку та жовтяницю. Найбільш поширеними збудниками цих захворювань є вірус мозаїки буряків (*Beet mosaic virus*) та вірус жовтяниці буряків (*Beet yellows virus*). Останнім часом на цукрових буряках почали з'являтися та стрімко поширюватись нові для України віруси, зокрема вірус некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ) (*Beet necrotic yellow vein virus*), який є збудником хвороби ризоманії – однієї з найнебезпечніших хвороб цукрових буряків [14, 22, 26].

Основними патологічними змінами, що спостерігаються за ураження рослин вірусом, є уповільнення їх росту і розвитку, процесів накопичення цукрів, порушення функціонування провідної системи, зміна забарвлення листків і пожовтіння жилок, видовження черешків центральних листків та поява звужених прямостоячих листових пластинок. На коренеплоді буряка помітно розростаються бічні корінці, він зменшується у розмірах, на поперечному розрізі можна спостерігати зміну кольору провідних судин – від блідо-жовтого до темно-коричневого [16, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28]. Ураження рослин ризоманією спричинює зниження врожайності на 50% і більше, при цьому значно зменшується цукристість коренеплодів.

Для своєчасного виявлення та ідентифікації збудників необхідно використовувати чутливі, надійні діагностичні тест-системи. Тому метою наших досліджень було ідентифікувати ВНПЖБ в агроценозах України та дослідити особливості його діагностування.

Методи досліджень. Нами було обстежено насадження цукрових буряків на території Центральної України (Черкаська обл., Уманський р-н). Відібрано для досліджень безсимптомні рослини цукрових буряків гібриду Леопард, а також 21 зразок рослин з нехарактерними для гібриду ознаками: видовжені та прямостоячі листки часто з мозаїчним забарвленням та посвітлінням жилок. Коренеплоди у відібраних рослин були деформовані, значно зменшені у розмірах.

Для проведення ПЛР нами було обрано 4 пари праймерів, оскільки симптоми, які ми візуально спостерігали на рослинах, відповідали кільком вірусам (табл.1). Праймери були розроблені нами попередньо і випробовані. Дизайн праймерів проводився на основі аналізу всіх нуклеотидних послідовностей, які занесено до всесвітньої генетичної бази даних, що гарантує їх чутливість та універсальність. Підтверджена ефективність їх використання [1, 2, 11, 12, 13, 14]. Синтез праймерів був здійснений за нашим замовленням компанією «Біолабтех» (Україна).

Реакційна суміш об'ємом 15 мкл містила: ×1 ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl₂ (AmpliSens, Росія), 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ) (AmpliSens, Росія), 1 пкмоль кожного з олігонуклеотидних праймерів, 10-40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полімерази (AmpliSens, Росія). Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (НПО ДНК-Технологія, Росія). Після ампліфікації продукти ПЛР розділяли методом горизонтального електрофорезу в 1,5 %-му агарозному гелі, який готува-

ли, використовуючи трис-боратний електродний (ТВЕ) буфер (10×ТВЕ: 890 мМ Трис, 890 мМ борної кислоти, 20 мМ ЕДТА, рН 8,3) з 0,5 мкг/мл бромиду етидію. Продукти ПЛР візуалізували УФ променями транслюмінатора (Т-312-С, Франція) і фотографували, використовуючи цифровий фотоапарат «Sony» (DSLR-A500, Китай).

Таблиця 1

Праймери для проведення ПЛР аналізу

Назва	Нуклеотидна послідовність 5'-3'		Розмір ампліконів
BNYVV-CP [12]	прямий	ttcggacgtcgtgagtgtta	419 п.н.
	зворотній	cccgagtccacattaatcc	
BNYVV-P42 [14]	прямий	aaaccggacattgcgattg	326 п.н.
	зворотній	accagaaaagtgtccaaccg	
BtMV [1]	прямий	ggccatacatgcctcgttat	239 п.н.
	зворотній	gtgagcgttgacatctgtgg	
BYV [2]	прямий	tcgcgttaggactttgttg	392 п.н.
	зворотній	gtgtgagtgccgttttcg	

Біологічне тестування проводили на рослинах: *Beta vulgaris* L. var. *saccharifera* L., *Chenopodium murale* L., *Tetragonia expansa* L. та *Gomphrena globosa* L., *D. metel* L. Інокуляцію рослин-індикаторів здійснювали механічно соком уражених та здорових рослин, а також очищеним вірусом. Рослини вирощували за температури +25 °С та 16 годинного світлового дня. Симптоми ураження фіксували на 8–21 день після інокуляції.

Очищення та концентрування ВНПЖБ проводили модифікованим нами методом диференційного центрифугування [30]. Вірус накопичували в рослинах *B. vulgaris* L. var. *saccharifera* і виділяли із листя з симптомами ураження ВНПЖБ у вигляді мозаїки та посвітління жилок. Рослинний матеріал гомогенізували в 0,05 М боратному буфері (рН 9) та додавали хлороформ у співвідношенні 2:1 для освітлення соку. У суміш вносили 4 % тритону X-100 і перемішували на холоді впродовж 30 хв з наступним центрифугуванням (4 тис об/хв, 15 хв). Вірусний препарат концентрували 4% ПЕГ та проводили 3 цикли диференційного центрифугування на холоді (5 тис об/хв, 20 хв; 27 тис об/хв, 60 хв). Після ультрацентрифугування надосадову рідину зливали, осад розтирали в 0,05 М боратному буфері. Концентрацію ВНПЖБ вимірювали спектрофотометрично на приладі СФ-26 (ЛОМО, Росія) при довжинах хвиль 260 нм та 280 нм, а для підтвердження наявності вірусу використовували електронну мікроскопію. Вірусні препарати контрастували 2 % ураніацетатом (УА). Сіточки продивлялись в електронному мікроскопі JEM 1400 (JEOL Ltd., Японія). Досліджували не менше 20 полів зору сіточки (за двома діагоналями під кутом 90°). Зображення ВНПЖБ фотографували та встановлювали довжину і ширину віріонів за масштабною лінійкою на електронограмі.

Для отримання поліклональних антитіл очищеним ВНПЖБ імунізували кроля породи шиншила. Для проведення 1-ї імунізації вводили 0,34 мг суспензії антигена (концентрація ВНПЖБ становила 5 мг/мл) з повним ад'ювантом Фрейнда у співвідношенні 1:1. Препарат вводили підшкірно у 10 точок вздовж хребта кроля. Через 3 тижні після 1-ї іму-

нізації внутрішньом'язово вводили 1 мг/мл вірусної суспензії з неповним ад'ювантом Фрейнда (1:1). Через 1 тиждень проводили останню імунізацію вірусним антигеном. Для цього ВНПЖБ, який попередньо розчиняли в фізіологічному розчині (0,05 мг), вводили у вушну вену кроля. Кров відбирали через 3 дні після останньої ін'єкції [30].

Титр отриманої сироватки визначали в непрямому варіанті твердофазного імуноферментного аналізу з використанням комерційного набору (Sediag, Франція) [3, 8]. Облік реакції проводили на рідері HUMAREADER Plus (HUMAN, Німеччина) через 1 хв після зупинки реакції. Визначали оптичну густина в лунках при довжині хвилі 405 нм. За титр приймали найбільше розведення, за якого значення оптичної густини перевищувало значення негативного контролю у 2 рази.

Гістохімічне визначення локалізації ферменту пероксидази здійснювали за бензидиновою реакцією [7, 23]. Активність пероксидази визначали спектрофотометричним методом за Бояркіним [15]. Зрізи тканин листових пластинок цукрових буряків обробляли сумішшю перекису бензидину (750 мг бензидину + 0,7 мл 3 % H_2O_2 , попередньо розчиненого в 500 мл 40 % етилового спирту) за кімнатної температури, після чого промивали 40 % спиртовим розчином. Отримані нативні препарати проглядали в мікроскопі Nikon Eclipse E-200 (NIKON INSTECH CO., LTD, Японія). Фотодокументацію результатів здійснювали з допомогою програмного забезпечення Camera Control Pro 2 (Китай). Для визначення активності пероксидази у тканинах листків за показниками інтенсивності гістохімічних реакцій використовували спеціалізоване програмне забезпечення Image-Pro Premier 9.1 (США).

Результати та обговорення. У зразках відібраних листків цукрових буряків під номерами 1, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 20, 21 за використання праймерів BNYVV-CP, VtMV та BNYVV-P42 (рис. 1) показано наявність ВНПЖБ. Одночасно з ВНПЖБ у зразках під номерами 4, 17, 18, 20, 21 було виявлено ВМБ.

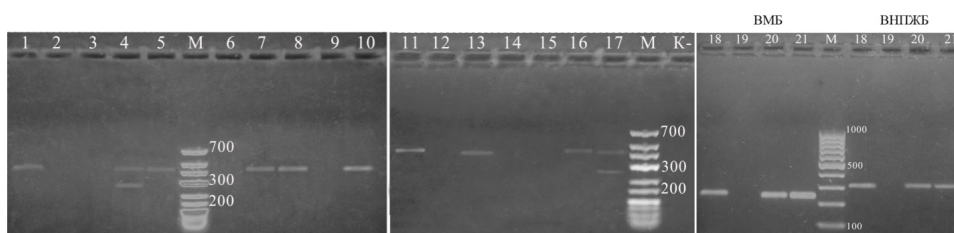


Рис.1. Електрофореграми продуктів ПЛР-аналізу ВНПЖБ, ВМБ в зразках (1 - 21) листків цукрових буряків: М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів), К - негативний контроль

Зразки рослин цукрових буряків під номерами 18, 19, 20, 21 були обрані для проведення ПЛР-аналізу коренеплодів. кДНК була отримана з тканин провідних пучків коренеплодів. Екстракцію РНК проводили з використанням комерційного набору (Рибо-Сорб, AmpliSens, Росія). Зворотню транскрипцію проводили, використовуючи комерційний набір (Реверта-L, AmpliSens, Росія) [13]. Наявність ВНПЖБ встановлено лише в зразку під номером 18 (за використання праймерів BNYVV-CP), на відміну від ВМБ,

який був присутній в зразках коренеплодів 18, 20, 21 (рис. 2). Таким чином, ПЛР-аналіз показав наявність ВНПЖБ в зразках листків цукрового буряка і відсутність інфекції в провідних пучків коренеплодів.

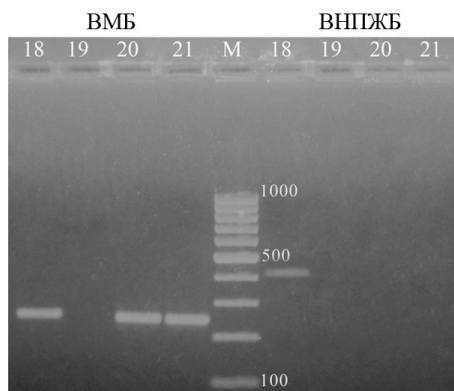


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР-аналізу ВНПЖБ, ВМБ в зразках коренеплодів цукрового буряка: М (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

Частини листової пластинки зразку цукрового буряка, в якому попередньо методом ПЛР показано наявність ВНПЖБ, використано для проведення біологічного тестування (рис. 3). Симптоми, які з'явилися на рослинах-індикаторах після механічної інокуляції вірусом, наведені в таблиці 1.

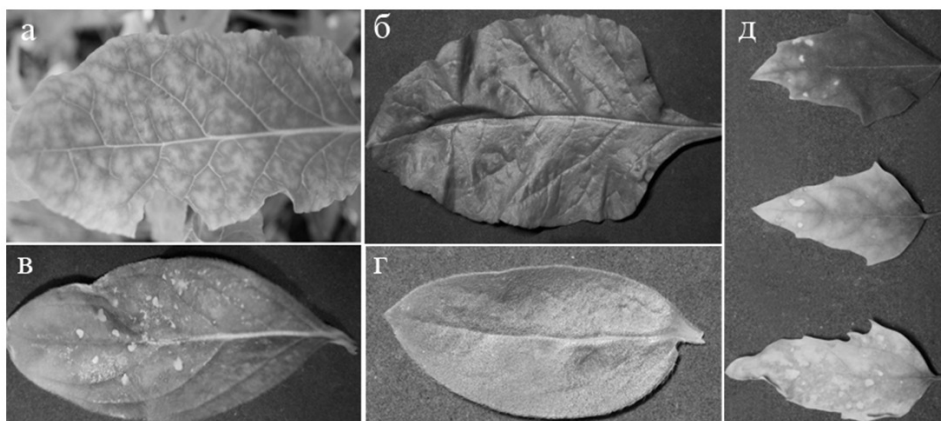


Рис. 3. Листкові пластинки рослин-індикаторів:

- а – мозаїка на поверхні листової пластинки *B. vulgaris* var. *saccharifera*;
- б – контроль. в – некрози на поверхні листової пластинки *G. globosa*;
- г – контроль. д – симптоми ураження у вигляді некрозів на поверхні листової пластинки *C. murale*.

Таким чином, методом біологічного тестування було підтверджено наявність ВНПЖБ у рослинах цукрового буряка, позаяк інфекційний матеріал з відібраних зразків викликав симптоми, характерні для цього вірусу.

В результаті трьох циклів диференційного центрифугування нами було отримано інфекційний очищений препарат ВНПЖБ, який мав ступінь очистки та концентрацію, необхідну для отримання специфічної антисироватки. Концентрація вірусного препарату становила 5 мг/мл. Очищений

вірусний препарат мав типовий для нуклеопротеїдів спектр поглинання в ультрафіолетовому промінні з мінімум поглинання 245 нм і максимум 260 нм. Співвідношення $A_{260/280}$ нм становило 3,2.

Таблиця 1

Реакція рослин-індикаторів на ураження ВНПЖБ

Рослини-індикатори	Симптоми
<i>B. vulgaris</i> var. <i>saccharifera</i>	Мозаїка, посвітління жилок на 8 день після інокуляції
<i>C. murale</i>	Численні місцеві некрози з чітким центром і коричневою облямівкою на 12 добу після інокуляції. Системна реакція проявлялася на всіх пагонах: пожовтіння, некротизація і відмирання пагонів
<i>T. expansa</i>	На 12 добу після інокуляції на листових пластинках з'явилися плями, які поступово через декілька днів некротизувалися
<i>G.globosa</i>	Численні некрози з червоною облямівкою на 14 день після інокуляції
<i>D. metel</i>	Некрози з коричневою облямівкою на 14 день після інокуляції

Методом електронної мікроскопії в очищених препаратах ВНПЖБ було встановлено наявність паличковидних віріонів діаметром 20 нм та довжиною близько 390 нм (рис. 4). Морфологічні параметри віріонів відповідають ВНПЖБ за літературними даними [4, 5].

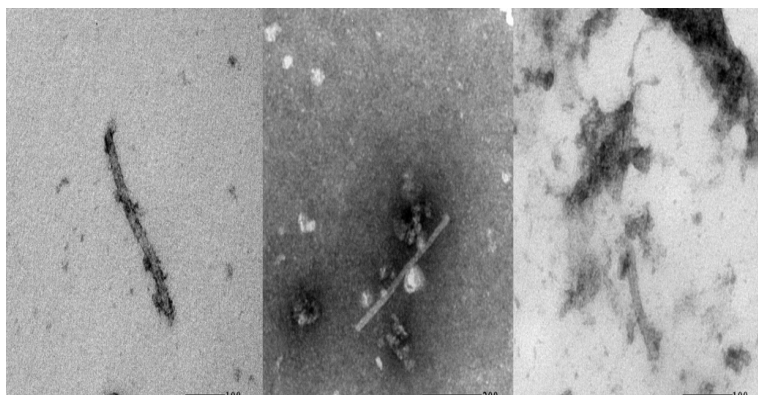


Рис. 4. Електроннограми ВНПЖБ: контрастування 2 % розчином УА (×60 тис. раз, бар А – 100 нм, Б – 200 нм)

Очищеним препаратом ВНПЖБ нами було інокульовано рослини *B. vulgaris* L. var. *saccharifera*. На 18 день після інокуляції на листках рослин спостерігались симптоми ураження ВНПЖБ у вигляді мозаїки і посвітління жилок (рис. 5).

Таким чином, нами було отримано очищений препарат ВНПЖБ, інокуляція яким здорових рослин *B. vulgaris* L. var. *saccharifera* викликала появу симптомів, які не відрізнялися за своїм характером та ступенем ураженості від таких, виявлених нами в польових умовах. Із рослин *B. vulgaris* L. var. *saccharifera*, інокульованих ВНПЖБ в умовах вегетаційного буди-

ночку, нами повторно було отримано очищений препарат ВВПЖБ, який в подальшому було використано як позитивний контроль для молекулярно-біологічних досліджень ізолату ВВПЖБ, виділеного в Черкаській області.



Рис. 5. Мозаїка та посвітління жилок листової пластинки рослини-індикатора *B. vulgaris L. var. saccharifera*

Отже, нами була підтверджена інфекційна природа захворювання рослин цукрових буряків за тріадою Коха.

Поліклональні антитіла для проведення непрямого імуноферментного аналізу для ідентифікації ВВПЖБ були отриманні шляхом імунізації кроля. Антитіла тестували методом непрямого імуноферментного аналізу з різними розведеннями антигенів (табл. 2). В лунки планшетів вносили сік здорової рослини (негативний контроль) та гомологічний антиген з концентрацією білка 1 мг/см³ у розведенні 1:100 у покривному буфері рН 9,6. Для титрування антитіл в лунки вносили подвійні розведення досліджуваної сироватки, починаючи з 1:200 до 1:12800. У результаті проведених досліджень встановлено, що одержана поліклональна сироватка містить специфічні до ВВПЖБ антитіла в титрі 1:6400.

Отже, нами отримано антисироватку до ВВПЖБ з високим титром, яка може бути використана для отримання специфічних діагностикумів, необхідних для детекції і скринінгу захворювань, зумовлених ВВПЖБ.

Таблиця 2
Результати визначення титру специфічних антитіл до ВВПЖБ

Розведення	Середнє значення оптичної густини при довжині хвилі 405 нм	Середнє квадратичне відхилення
Контроль	0,213	0,001
1:200	1,840	0,002
1:400	1,668	0,002
1:800	1,328	0,002
1:1600	0,959	0,003
1:3200	0,694	0,018
1:6400	0,465	0,010
1:12800	0,217	0,015

Одним із компонентів системи конституціональної стійкості рослин є ферменти групи оксидаз. Як маркер стійкості рослин досить часто використовують пероксидазу [19]. Це пов'язано з тим, що захисні реакції рослин проти фітопатогенів супроводжуються активацією вільних і слабкозв'язаних аніонних і катіонно-аніонних пероксидаз, які беруть участь у розвитку реакцій індукованого неспецифічного імунітету, формуванні тканинних бар'єрів через полімеризацію фенольних сполук і лігніфікацією клітинних стінок [10, 18]. Активація пероксидаз спостерігається за інфікування рослин грибами [9], бактеріями [24] та вірусами [17] і розглядається як захисна реакція рослинних організмів [30].

Для гістохімічних досліджень вірусного патогенезу нами були використані уражені і безсимптомні рослини цукрових буряків. З'ясовано, що в провідних пучках листків у клітинних стінках паренхіми і ситоподібних трубок флоєми вміст аніонних пероксидаз є порівняно високим (рис. 6).

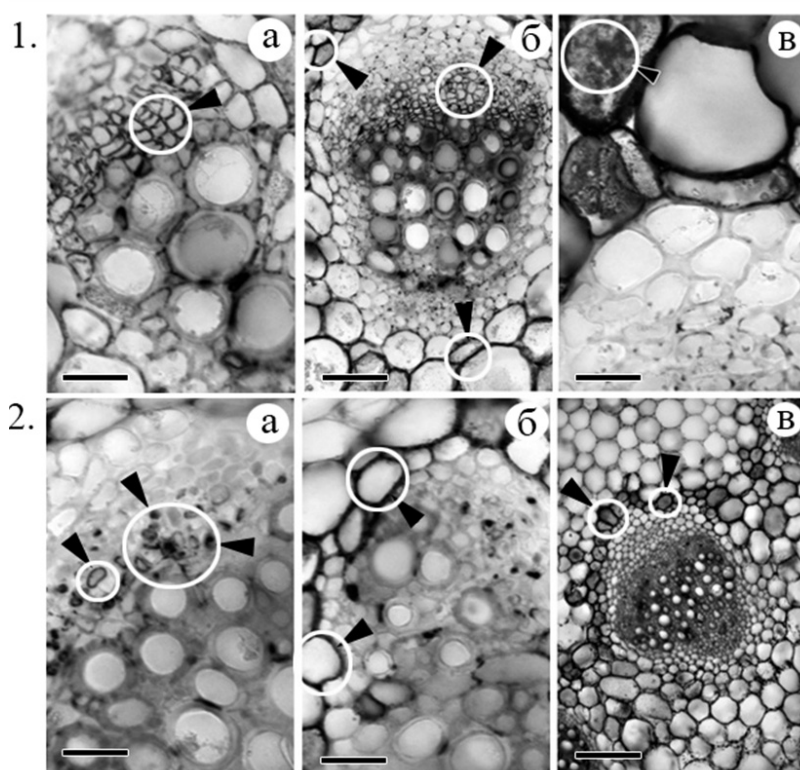


Рис. 6. Локалізація пероксидази в тканинах провідних пучків і паренхіми центральних жилок листків цукрових буряків

1. – жилки безсимптомних рослин: а, б – провідні пучки, у яких пероксидаза виявляється в клітинних стінках флоєми і паренхіми (стрілками позначено локалізацію пероксидази); в – клітини паренхіми кори з високим вмістом ферменту; 2. – жилки рослин цукрових буряків, що інфіковані ВВПЖБ: а – фрагмент провідного пучка (стрілками позначено підвищений вміст пероксидаз у ситоподібних трубках); б – підвищена активність пероксидази, яка зв'язана з клітинними стінками клітин обкладинки (стрілками позначено локалізацію пероксидази); в – нагромадження пероксидази в клітинних стінках ендокортекса; лінійки: 1-а і 2-а,б – 50 μm ; 1-б – 100 μm ; 1-в – 20 μm ; 2-в – 200 μm

Гістохімічні реакції показали, що у листках цукрових буряків, які інфіковані ВНПЖБ, вміст зв'язаних з клітинними стінками пероксидаз збільшувався переважно у матриці клітинних стінок ендокортексу, а також камбіальних клітин відкритих колатеральних пучків. За реакцією окиснення бензидину ці клітини на зрізах виділялися значною інтенсивністю забарвлення клітинних стінок (рис. 6 (2), б-в).

У паренхімі флоєми і ситоподібних трубках провідних пучків листків вірусінфікованих рослин інтенсивність гістохімічної реакції на пероксидазу підвищувалася майже в 2 рази. У рослинному організмі вірусна інфекція супроводжувалася дифузним розподіленням пероксидази в протопластах клітин флоєми, а також активним нагромадженням ферменту в клітинних стінках обкладинок провідних пучків. Висока активність пероксидаз сприяє синтезу суберину, лігніфікації клітинних стінок через окиснювання оксикоричних спиртів з утворенням фенольних радикалів і їх подальшою полімеризацією в лігнін. Внаслідок цього може суттєво знижуватися транслокація збудників по провідних пучках. Отже, пероксидазний тест є досить інформативним для визначення потенційної резистентності рослин цукрових буряків до патогенних організмів і вірусів.

ДИАГНОСТИКА ВИРУСА НЕКРОТИЧЕСКОГО ПОЖЕЛТЕНИЯ ЖИЛОК СВЕКЛЫ, ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО В УКРАИНЕ

*Е.В. Гринчук¹, И.А. Антипов¹, А.Н. Кириченко²,
Г.В. Краева², А.Ф. Лиханов³*

*¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины,
ул. Героев Оборонь, 15, Киев, 03041, Украина*

*²Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

*³Институт эволюционной экологии НАН Украины,
ул. акад. Лебедева, 37, Киев, 03143, Украина*

Резюме

Цель. Определение вируса некротического пожелтения жилок свеклы (ВНПЖС), циркулирующего в агроценозах Украины, и отработка ряда методов его идентификации. **Методы.** Работа выполнена с использованием классических вирусологических и молекулярно-биологических методов диагностики и идентификации вирусных патогенов, в том числе электронной микроскопии, метода растений-индикаторов, полимеразной цепной реакции (ПЦР). ВНПЖС был очищен, подтверждена инфекционная природа заболевания растений сахарной свеклы согласно триаде Коха. Для исследования реакции растительных клеток на поражение вирусом были выполнены гистохимические исследования. **Результаты.** Рассмотрен ряд методов диагностики ВНПЖС. Путем иммунизации кроля очищенным вирусом получены сыворотки крови с высоким содержанием антител к ВНПЖС, которые в дальнейшем могут быть использованы для серологической диагностики данного возбудителя. Наличие ВНПЖС также было подтверждено методом электронной микроскопии и с использованием метода биологического тестирования вируса. Установлено, что в клетках флоэмы проводящих пучков листьев сахарной свеклы, инфицированных ВНПЖС, концентрация пероксидаз, связанных с клеточными стенками, уменьшается на фоне накопления свободных изоферментов в протопластах. Перераспределение молекул

пероксидазы в компартаментах клеток сопровождается значительным повышением их активности. **Выводы.** В агроценозах Черкасской области сахарная свекла поражена вирусами некротического пожелтения жилок свеклы и мозаики свеклы. Наличие смешанной инфекции в растениях было подтверждено методом ПЦР. Симптомы, индуцируемые вирусом на растениях-индикаторах, были типичными для ВНПЖС. Показана возможность потенциальной экспресс-диагностики гистохимическим методом. Рекомендуется проверять наличие вируса некротического пожелтения жилок свеклы как в листьях, так и в корнеплодах растений сахарной свеклы.

Ключевые слова: вирус некротического пожелтения жилок свеклы, вирус мозаики свеклы, идентификация ВНПЖС, сахарная свекла, полимеразная цепная реакция.

THE DIAGNOSIS OF BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS CIRCULATING IN UKRAINE

*K. Hrynychuk¹, I. Antipov¹, A. Kyrychenko²,
H. Kraeva², A. Likhanov³*

¹ National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
15 Heroyiv Oborony Str., Kyiv, 03041, Ukraine

² Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
154 Akad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

³Institute for evolutionary ecology, NAS of Ukraine,
37 Acad. Lebedeva Str., Kiev, 03143, Ukraine

Summary

Aim. This study was conducted to determine the prevalence of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) circulating in agroecosystems of Ukraine and to develop some methods for detecting and identifying the virus. **Methods.** The classical virology and molecular biological methods were used for the diagnosis and identification of viral pathogens, in particular, electron microscopy, plant-indicator method, polymerase chain reaction (PCR). The BNYVV was purified and all Koch's postulates to improve infectious nature of the disease were fulfilled. To investigate the plant cell responses to the virus infections we performed histochemical analysis. **Results.** The study contains results on various methods used for the diagnosis of BNYVV. Polyclonal rabbit sera, obtained as a result of virus immunization contained high-titre antibodies. Specific antiviral antibodies can be used for a serological diagnostic system development. The presence of BNYVV has also been confirmed by electron microscopy and mechanical inoculation of the indicator plant. It was established significant decreasing of the cell-wall-bound peroxidase concentration in phloem cells of conducting beams of sugar beet infected with BNYVV. At the same time, the accumulation of free isoenzymes in protoplasts was observed. Such a redistribution of peroxidase molecules in cell compartments is accompanied by a significant increase in their activity. **Conclusions.** The survey of agroecosystems in Cherkassy region showed sugar beets are infected with both Beet necrotic yellow vein virus and Beet mosaic virus. The presence of a mixed infection in plants was confirmed by PCR. Indicator plants using in bio-test detection of the virus produced typical BNYVV symptoms. It was shown the possibility of rapid BNYVV diagnosis by the histochemical method. It is recommended to examine the virus presence both in leaves and in root crops of sugar beet plants.

Keywords: beet necrotic yellow vein virus, beet mosaic virus, identification of BNYVV, sugar beet, polymerase chain reaction.

1. Andrusyk I, Antipov I, Bogach E. [PCR-diagnostics and identification of beet mosaic virus.] *Biological Resources and Nature Management*. 2014; 6 (5-6): 11-13. Ukrainian.
2. Andrusyk I, Antipov I, Kyrychenko A. [PCR diagnosis and identification of sugar beet yellow virus.] *Visnyk of the Sumy National University*. 2013; 11(26): 42–46. Ukrainian.
3. Antibodies. Methods. In: Catty D. editor. Moscow:Mir, 1991; 2. 384 p. Russian.
4. Brown F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of International Committee on Taxonomy of Viruses in Edmonton, Canada. *Inter-virology*. 1989; 30(4): 181-86.
5. Fauquet MC, Mayo MA, Maniloff J et al. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. USA: Elsevier, 2005; 1562.
6. Finkenstadt VL. A review on the complete utilization of the sugar beet. *Sugar Tech*. 2013; 16(4):339-46.
7. Furst HH. [Methods of anatomical and histochemical investigation of plant tissues]. M.: Nauka, 1979;40-65 p. Russian.
8. Gnutova RV. [Serology and immunochemistry of plant viruses]. Moscow: Nauka, 1993. 300 p. Russian.
9. Harrison SJ, Curtis MD, McIntyre CL et al. Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Mol. Plant Microbe Interact*. 1995; 8(3): 398-406.
10. Hiraga S, Yamamoto K, Ito H. et al. Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Lett*. 2000; 471:245-50.
11. Hrynchuk K, Antipov I, Ermolaev M. [Beet necrotic yellow vein virus: PCR-diagnostics and identification of Ukrainian isolates]. *Quarantine and plant protection*. 2015; 7(1):28-34. Ukrainian.
12. Hrynchuk K, Antipov I, Ermolaev M. [The development of PCR system for identification of beet necrotic yellow vein virus and monitoring in Ukraine]. *Scientific Herald of Chernivtsy University. (Biological Systems)*. 2015; 7(1):28-34. Ukrainian.
13. Hrynchuk K, Antipov I. [Molecular diagnostics and identification of the beet necrotic yellow vein virus: methodical recommendations]. Kiev. 2015; 24 p. Ukrainian.
14. Hrynchuk K. *Molecular diagnostic and identification of beet necrotic yellow vein virus [dissertation]*. Kiev: National University of life and environmental sciences; 2016.
15. Klein RM. *Methods for studying plants*. Moscow: Kolos: 1974; 527 p. 11.
16. Klyachenko OL. *Testing of beet necrotic yellow vein virus by the method of molecular hybridization of nucleic acids [dissertation]*. Moscow; 1993.
17. Lagrimini ML, Joly RJ, Dunlap JR et al. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol*. 1997; 33:887-95.
18. Lucena MA, Romero-Alanda R, Mecardo JA et al. Structural and physiological changes in the roots of tomato plants over-expressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant*. 2003; 118:422-29.
19. Lukyanenko T, Hrygoryuk I, Lihanov A. Peroxidase as a resistance marker of the genus *Aesculus* L. to horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka et Dimič). *Quarantine and plant protection*. 2014; 4:13-15.

20. Manco OA. Rhizomania sugar beet - selection for stability. [dissertation]. Kiev: Institute of sugar beet UAAS; 2003.
21. Moskovets SN, Bobyr AD, Glushak LE, Onishchenko AN. [Viral diseases of farm crops]. Kyiv: Urozhay, 1975; 152 p.
22. Nurmammedov AK. Increasing of the stability of sugar beets to pathogens of rhizomania, rotten root crops and coronet stains: [dissertation]. Kiev: National University of life and environmental sciences; 2006;
23. Pausheva ZP. [Workshop on cytology of plants]. Moscow: Agropromizdat. 1988;271 p. Russian.
24. Rasmussen J, Smith J, Williams S. et al. cDNA cloning and systemic expression of acidic peroxidases associated with systemic acquired resistance to disease in cucumber. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1995; 46:389-400.
25. Roik MV, Nurmammedov AK, Kornienko AS. Diseases of sugar beet root crops: coronoid stains, rotten root crops in the period of vegetation, rhizomania, non-parasitic diseases. K.: Polygraph Consulting, 2004; 213 p.
26. Roik MV, Nurmammedov AK, Vasiliev NO et al. Methodical recommendations for the diagnosis of beet necrotic yellow vein virus [methodical recommendations]. Kiev: Koloobih, 2005; 27 p.
27. Rush CM, Liu H, Lewellen RT et al. The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Plant Disease.* 2006; 90(1):4-15.
28. Shevchenko ZhP, Helman LV, Nevyga OE, et al Virus and mycoplasma diseases of field crops. K.: Urozhay, 1975;152 p.
29. Thordal-Christinsen H, Zang Z, Wei Y et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley - powdery mildew interaction. *Plant J.* 1997; 11:1187-194.
30. Žižytė MG. The identification and molecular characterization of sugar beet rhizomania causing virus: summary of doctoral dissertation, biomedical sciences, biology (01 B), microbiology, bacteriology, virology, mycology (B 230) Vilnius, 2010; 37 p.

Отримано 26.04.2017