



Рослинництво, кормовиробництво

УДК 578.4.:578.864.(635.21)

© 2016

О.П. Таран,

кандидат біологічних наук

М.М. Лісовий,

*доктор сільсько-
господарських наук*

*Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України*

Р.О. Бондус,

*кандидат сільсько-
господарських наук*

*Устимівська дослідна
станція рослинництва
Інституту рослинництва
імені В.Я. Юр'єва НААН*

ДОСЛІДЖЕННЯ НЕКРОТИЧНОГО ТА ОРДИНАРНОГО ІЗОЛЯТІВ Y-ВІРУСУ КАРТОПЛІ

Мета. Встановити біологічні характеристики 2-х ізолятів Y-вірусу картоплі, що належать до різних штамових груп. Один з ізолятів спричиняв некротичні симптоми на рослинах картоплі, інший — симптоми легкої мозаїки. **Методи.** Біологічне тестування на рослинах-індикаторах. Прямі методи дослідження вірусів: електронна мікроскопія з негативним контрастуванням, твердофазний імуноферментний аналіз для дослідження та ідентифікації виявлених ізолятів.

Результати. Виявили 2 ізоляти Y-вірусу картоплі, один з яких спричиняв смугасту мозаїку, інший — легку мозаїку. Некротичний ізолят, який спричиняв легку мозаїку на рослині-хазяїні — картоплі, зумовлював симптоми системного некрозу на рослинах-індикаторах *N. tabacum* (сорт Самсун). Ординарний ізолят, що індукував смугасту мозаїку в рослин картоплі, у рослин-індикаторів зумовлював легку мозаїку. **Висновки.** Досліджено біологічні характеристики 2-х ізолятів Y-вірусу картоплі. Установлено, що за фенотиповим проявом інфекції на рослинах-індикаторах ці ізоляти належать до різних штамових груп — групи некротичних та ординарних штамів. Для встановлення філогенетичної спорідненості виявлених ізолятів потрібні подальші молекулярно-біологічні дослідження.

Ключові слова: картопля, тютюн, Y-вірус картоплі, некротичний штам, індикаторні рослини, імуноферментний аналіз.

Підтримка агробіорізноманіття неможлива без використання значного спектра сортів культурних рослин. Завдяки широкому сортовому складу культур задовольняється потреба в асортименті продукції сільського господарства, забезпечується отримання сталих урожаїв і створюються

основи біобезпеки держави. Важливим питанням є отримання насінневого матеріалу різних сортів, який має відповідати вимогам високої кондиції і бути вільним від хвороботворних організмів.

Виявлення інфекцій вірусів, які є шкочинними для культури картоплі, особливо

потрібне для програм сертифікації насіння. Зокрема, це Y-вірус картоплі (*Potato virus Y, PVY*), який набув значного поширення в культурі картоплі і може знижувати врожайність бульб на 30–70%. Його штами можуть індукувати суворі симптоми не лише на листках рослин, а й на бульбах, спричиняючи хворобу некротичної кільцевої плямистості бульб картоплі. Виявлення цих штамів має надзвичайно велике значення для розробки дієвих стратегій контролю вірусної інфекції [1, 2]. Мінливість симптомів вірусної інфекції, яка створює перешкоди для виявлення інфікованих рослин, може бути зумовлена особливостями сорту і дією абіотичних факторів. Усвідомлення того, що PVY стає першочерговою загрозою для програм сертифікації насіння картоплі, спонукає вірусологів детально дослідити всі фактори, які можуть призвести до цього.

Класифікація ізолятів PVY історично склалася на основі реакції надчутливості в рослин картоплі з генами стійкості *Nytr* або *Nc* та дослідження індукування некрозів на рослинах тютюну *N. tabacum*. Із відомих нині 5-ти штамових груп PVY лише ізоляти груп PVY^N PVY^{NTN}, здатні спричинити некроз у рослин тютюну [3].

Крім того, нові штами, що розвинулися як рекомбінантні варіанти PVY (PVY^{N:O}, PVY^{N-WI} і PVY^{NTN}), часто пов'язані з помірними симптомами на листках. Ці симптоми можуть мати тимчасовий характер у багатьох популярних сортів картоплі або ж інфекція може бути безсимптомною [4, 5]. Відсутність симптомів на рослинах на селекційних ділянках часто вважається виявом резистентності до вірусу, коли насправді це може свідчити про безсимптомну інфекцію у рослин толерантного сорту. Ці сорти іноди мають уміст вірусної інфекції, який аналогічний або перевищує цей показник у сортів з чіткими симптомами [6]. У насадженнях цих безсимптомних або тимчасово симптоматичних сортів дуже важко візуально виявити в польових умовах рослини з інфекцією вірусу. Це призводить до недооцінки інфікованості насаджень PVY і спричиняє високу інфікованість вірусом наступних поколінь насіння картоплі. Тому зі створенням нових сортів картоплі та для ефективного культивування наявних сортів слід вивчати не лише різноманіття вірусів, що інфікують культуру, а й різноманіття їх штамів.

Мета досліджень — біологічне тестування 2-х ізолятів PVY, що спричиняють різні

симптоми на рослинах картоплі для встановлення штамової належності ізолятів.

Матеріали та методи досліджень. Ідентифікацію вірусів було виконано за допомогою ELISA (подвійний сендвіч-варіант, DAS-ELISA), комерційних тест-систем (LOEWE, Німеччина). Результати зареєстровано за довжини хвилі 405/630 нм на спектрофотометрі Термо Labsystems Opsis MR (США) із програмним забезпеченням [7]. Обробку даних оптичної щільності зразків виконано за допомогою визначення середнього значення даних і стандартного відхилення. Поріг оптичної щільності, який відрізняє позитивні результати ферментативної реакції від величини фону, було визначено для кожної пластини індивідуально згідно з методикою. Морфологію вірусних частинок у соку картоплі досліджували за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії (JEM 1230 мікроскоп (JEOL, Японія) з використанням негативних контрастних агентів: 2%-го розчину фосфорно-вольфрамової кислоти і 2%-го розчину урацилу ацетату впродовж 2 хв [8]. Для біологічного тестування брали рослини *Nicotiniana tabacum* L., які інюкулювали гомогенатом із листя рослин картоплі у віці 4–6-ти листків. Після інюкації рослини тютюну культивували в умовах лабораторії. Рослини картоплі *S. tuberosum* сортів Слов'янка і Леді Розетта вирощували в умовах культивативної кімнати з бульб, відібраних у польових умовах попереднього сезону.

Результати досліджень. У рослин картоплі, які культивували в умовах культивативної кімнати, на молодому листі до цвітіння виявили симптоми у вигляді некротичних штрихів на жилках листя, які є типовими ознаками смугастої мозаїки. Ізолят вірусу з цих рослин ми позначили як 19Pot. Інший ізолят — 6Pot, інфікував рослини картоплі безсимптомно або вияв інфекції був у вигляді легкої мозаїки (рис. 1).

Методом DAS-ELISA підтверджено наявність у рослин картоплі, інфікованих ізолятами 6Pot і 19Pot, антигенів PVY (табл. 1).

Високі показники оптичної щільності зразків свідчать про активне накопичення вірусу в рослинах картоплі за інфікування цими ізолятами.

Під час електронно-мікроскопічного дослідження неочищених препаратів із листків картоплі *S. tuberosum*, інфікованих ізолятом 19Pot, виявили ниткоподібні вірусні частинки розміром 710×11 нм, а в препараті



а



б

Рис. 1. Симптоми на рослинах картоплі *S. tuberosum*, інфікованих ізолятами PVY: а — ізолят 6Pot; б — ізолят 19Pot

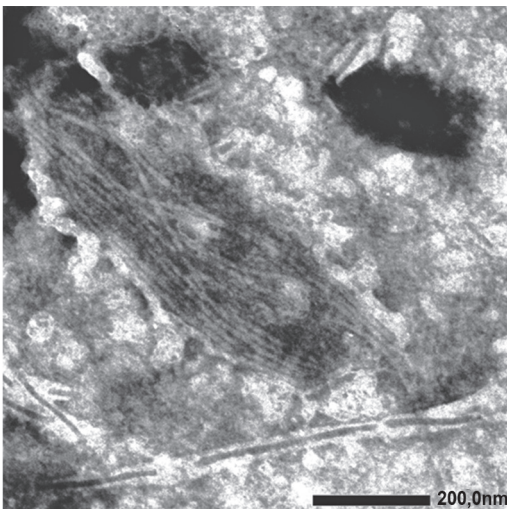
Уміст антигенів PVY у рослинах картоплі *Solanum tuberosum* L., інфікованих ізолятами 6Pot і 19Pot

Ізолят	Антиген		
	PVY	PVM	PLRV
19Pot	2,918±0,012	0,054±0,008	0,047±0,005
6Pot	0,815±0,012	0,063±0,012	0,045±0,004
Негативний контроль	0,042±0,005	0,048±0,009	0,035±0,008
Позитивний контроль	3,005±0,009	0,735±0,021	0,428±0,015

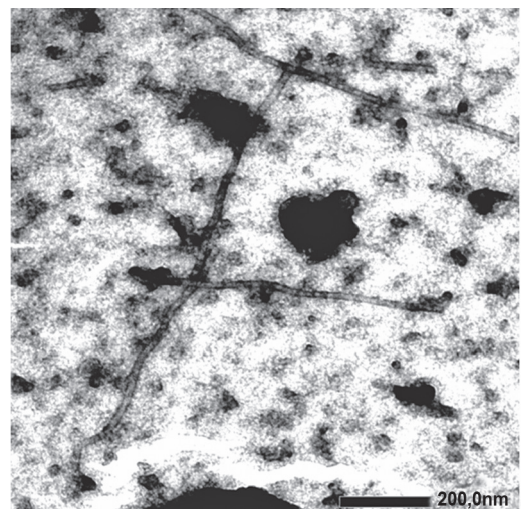
з рослини, інфікованої 6Pot, — ниткоподібні віріони розміром 670×12 нм (рис. 2).

Поява симптомів і тяжкість перебігу хвороби, спричиненої PVY, залежать від сорту картоплі, штаму PVY та умов навколишнього середовища, а також від того, чи є тип інфекції первинним (інфіковано в поточний сезон) або вторинним (інфекція передається через бульбове покоління) [9]. Ми припустили, що виявлені ізоляти належать до різних штамових груп вірусу, тому було проведено дослідження з використанням рослин-індикаторів.

Перші ознаки інфекції вірусу на рослинах тютюну *N. tabacum* виявили на 9-й день після



а

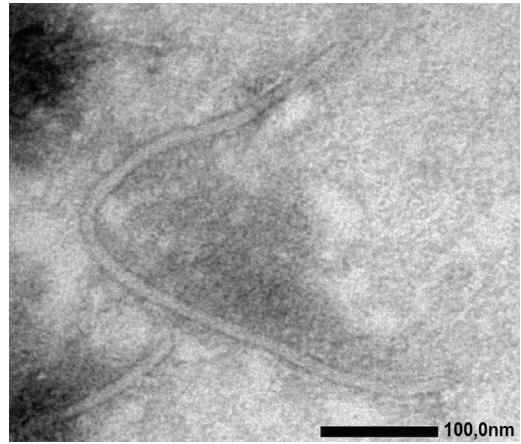


б

Рис. 2. Електронограма вірусних частинок, виявлених у листках картоплі *S. tuberosum*: а — ізолят 6Pot (контрастування 2% ФВК); б — ізолят 19Pot (контрастування 2% урацил ацетатом)



а



б

Рис. 3. Інокуляція ізолятом 6Pot рослин тютюну *N. tabacum*: а – симптоми вірусної інфекції на листках (загальний вигляд ураження); б – вірусні частинки, виявлені в рослинах *N. tabacum* (вигляд під електронним мікроскопом)

інокуляції ізолятом 6Pot у вигляді посвітління жилок молодих листків. Верхній листок в окремих випадках деформувався поперек центральної жилки. Пізніше на листках інфікованих рослин виявили некроз жилок, який поширився на центральну і жилки 1- і 2-го порядків. Поширення некрозу починалося з базальної частини листової пластинки (рис. 3).

На відміну від розвитку інфекції вірусу за інокуляції ізолятом 6Pot, інокуляція ізолятом 19Pot рослин тютюну не зумовлювала утворення видимих симптомів. Загалом інфекція спричиняла лише легку мозаїку і деяку деформацію тканини листка (рис. 4).

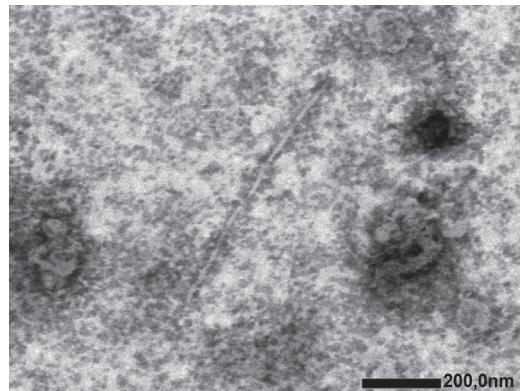
Згодом симптоми мозаїки зникали.

Розміри вірусних частинок для ізолятів 6Pot становили 668×12 нм, 19Pot — 760×13 нм, що відповідає морфології частинок PVY [10]. Діагностування зразків рослин тютюну DAS-ELISA на наявність вірусів підтвердило, що виявлені частинки належать вірусу PVY. Антигенів інших вірусів не виявлено, це свідчить про те, що симптоми некрозу рослин тютюну спричинені інфекцією вірусу PVY (рис. 5).

Слід зазначити, що в раніше проведених дослідженнях виявлено значне поширення некротичних штамів PVY на рослинах картоплі



а



б

Рис. 4. Інокуляція ізолятом 19Pot рослин тютюну *N. tabacum*: а – симптоми вірусної інфекції на листках (загальний вигляд ураження); б – вірусні частинки, виявлені в рослинах *N. tabacum* (вигляд під електронним мікроскопом)

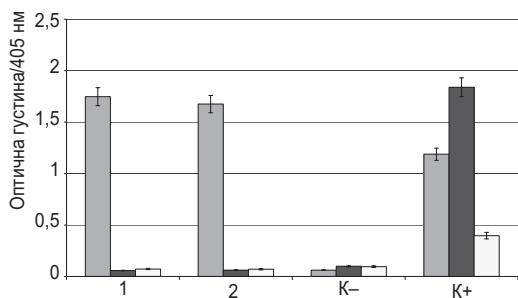


Рис. 5. Уміст антигенів вірусів у соку рослин *N. tabacum*, інокульованих ізолятами з рослин картоплі: 1 — ізолят 6Pot; 2 — ізолят 19Pot; K- — негативний контроль; K+ — позитивний контроль; ■ — PVY; ■ — PVM; □ — PLRV

в зоні Полісся України [11]. Крім того, вивченням філогенезу Українського ізоляту PVY

доведено, що він є рекомбінантним вірусом із можливими фенотиповими виявами ординарного штаму O і некротичного штаму N, що залежить від конкретних умов розвитку вірусної інфекції.

Ці причини спонукають до проведення поглиблених досліджень популяції PVY в Україні для вжиття дієвих заходів контролю за цим небезпечним патогеном. У вивченні взаємодії вірусу важливим є поєднання різних підходів, що сприятиме отриманню повного розуміння взаємодії рослини-хазяїна і PVY. Результати біохімічних, транскриптомних, протеомних і метаболічних досліджень дадуть можливість побудувати модель відповіді рослин на інфекцію PVY. Ця модель в подальшому дасть змогу прогнозувати результати інфекції вірусу, які можуть бути корисними в селекції картоплі [12].

Висновки

Показано наявність у картоплі, культивованої в Україні, ізолятів PVY, що належать за біологічним виявом до різних штамових груп: ординарних штамів PVY^O і некротичних штамів PVY^N. З огляду на високу здатність до рекомбінації між штаммами PVY і можливість появи агресивніших рекомбінантних варіантів вірусу,

особливо в групі штамів PVY^N, потрібні подальші дослідження для встановлення філогенетичної спорідненості виявлених нами ізолятів PVY. Крім того, необхідний моніторинг інфекції різних штамів PVY в насадженнях картоплі, що дасть можливість розробити дієві заходи контролю за небезпечними штаммами вірусу.

Бібліографія

1. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States/L.M. Piche, R.P. Singh, X. Nie, N.C. Gudmestad//Phytopathology. — 2004. — V. 94. — P. 1368–1375.
2. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology/K.B. Scholthof, S. Adkins, H. Czosnek et al.//Mol. Plant Pathology. — 2012. — V. 12. — P. 938–954.
3. Potato virus Y: a century of evolution/A. Blanchard, M. Rolland, C. Lacroix et al.//Current Topics in Virology. — 2008. — V. 7. — P. 21–32.
4. McDonald J.G. Host range, symptomatology and serology of isolates of Potato virus Y (PVY) that shared properties with both the PVY^N and PVY^O strain groups/J.G. McDonald, R.P. Singh//Am. Potato J. — 1996. — V. 73. — P. 309–315.
5. Response of potato cultivars to five isolates belonging to four strains of Potato virus Y/B. Nie, M. Singh, A. Murphy et al.//Plant Diseases. — 2012. — V. 96. — P. 1422–1429.
6. Potato cultivars differ in current season Potato virus Y (PVY) infection/P.B. Hamm, D.C. Hane, M.J. Pavsek et al.//Am. J. Potato Res. — 2010. — V. 87. — P. 19–26.
7. Міщенко Л.Т. Вірусні інфекції картоплі та їх перебіг за умов модельованої мікрогравітації/Л.Т. Міщенко, В.П. Поліщук, О.П. Таран, О.І. Гордейчик. — К.: Фітосоціоцентр, 2011. — 144 с.
8. Салига Ю.Т. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів/Ю.Т. Салига, В.В.Снітинський. — Львів, 1999. — 152 с.
9. Karasev A.V. Genetic Diversity of the Ordinary Strain of Potato virus Y (PVY) and Origin of Recombinant PVY Strains/A.V. Karasev//Phytopathology. — 2011. — V. 101. — P. 778–785.
10. Brunt A.A. Potyviruses/A.A. Brunt/Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes (Ed. G. Loebeinstein et al.). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2001. — P. 77–87.
11. Шевченко О.П. Розповсюдження та діагностика некротичних штамів Y-вірусу картоплі на Поліссі України/О.П. Шевченко//Вісн. ХНАУ. Сер. «Рослиництво, селекція, насінництво, овочівництво». — X., 2006. — № 5. — С. 110–115.
12. Kogovšek P. Physiology of the potato-Potato virus Y interaction/P. Kogovšek, M. Ravnikar. — Progress in Botany. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. — 2013. — V. 74. — P. 101–133.

Надійшла 24.06.2016.