

М.Д. МЕЛЬНИЧУК, С.О. СМИРНОВА,
Е.В. КАЧУРА, Г.В. СМИРНОВА
Національний аграрний університет

ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ В АГРОЦЕНОЗАХ УКРАЇНИ

Обстежено агробіоценози цукрових буряків (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) Київської області на вірусоносійство. Діагностику РНК-вмісних вірусів здійснювали за допомогою методу електронної мікроскопії та хроматографічної очистки реплікативних форм РНК целюлозним градієнтом із подальшим проведенням електрофорезу. Досліджено сезонну динаміку розвитку фітовірусів.

Вступ. В останні роки у зв'язку з погіршенням загальної фітосанітарної ситуації на полях України шкодочинність ряду вірусних хвороб цукрових буряків набула великого розмаху. Жовтяниця та мозаїка широко розповсюджені в усіх районах вирощування цукрових буряків, в тому числі і в Україні, і є одними з основних захворювань цієї культури. При ранньому ураженні втрати врожаю коренеплідів можуть становити 30-40%, насіння - 40-60%, цукристість може знижуватись на 1,3 - 5,0 % [1].

Для прогнозування і своєчасного проведення необхідних захисних заходів важливо точно визначити характер захворювання. Чималою значення діагностика набуває при оцінці вихідного та селекційного матеріалу на стійкість до вірусних хвороб і, особливо, рослин-продуцентів насіння цієї цінної технічної культури.

На сьогодні використовується багато різноманітних методів для діагностики та ідентифікації фітовірусів. Найбільш актуальними і точними є молекулярно-біологічні та біохімічні методи діагностики патогенів, що уражують рослини [5].

Саме тому метою досліджень було обстеження плантацій цукрових буряків у Київській області на вірусоносійство, використовуючи методи електронної мікроскопії, хроматографічної очистки дволанцюгових (дл)РНК через целюлозний градієнт та електрофорезу.

© 2003 М.Д. МЕЛЬНИЧУК, С.О. СМИРНОВА, Е.В. КАЧУРА,
Г.В. СМИРНОВА Національний аграрний університет

Матеріали і методи. Рослинний матеріал відбирали на полях цукрових буряків Рокитнянського, Кагарлицького та Сквирського районів Київської області, гібридів Український ЧС 70 та Білоцерківський ЧС 90. Візуальну діагностику та обстеження на вірусоносійство проводили протягом травня - вересня 2002 року. Рослини досліджували на 2-метрових відрізках двох паралельних рядків у 10 місцях поля. Матеріал відбирався з тих частин рослини, які мали найбільш виражені вірусоспецифічні симптоми: хлороз, мозаїка, просвітління та потовщення жилок, деформація листкової пластинки, енації, некрози, гофрування. З кожного симптому формували окрему пробу, яку мацерували у фарфоровій ступці за допомогою рідкого азоту в присутності 0,1 М амоній-ацетатного буферного розчину (рН 7,4). Маса зразка для виділення дволанцюгових рибонуклеїнових вірусспецифічних кислот становила 3,5 г [7].

Виділення, діагностику та ідентифікацію дволанцюгових рибонуклеїнових кислот проводили за методом, описаним раніше [8, 3, 4].

Електронно-мікроскопічні дослідження проводили за допомогою методу негативного контрастування [2,6] на електронному мікроскопі EMВ-100А при збільшенні в 20000-40000.

Результати та обговорення. При аналізі рослинних зразків із плантацій цукрових буряків були виявлені домінуючі симптоми: хлороз, просвітління та потовщення жилок, мозаїчне забарвлення, а також деформації листкової пластинки, енації, гофрування, інколи точкові некрози (рис.1). Найбільш розповсюдженими були симптоми жовтухи чи мозаїк різного типу, що домінували над іншими симптомами ураження. У першій половині вегетаційного періоду превалювали такі симптоми, як мозаїка, деформації листкової пластинки та енації, які в подальшому доповнювалися всіма вищезгаданими симптомами. При візуальній оцінці в середньому кількість хворих рослин в полі становила від 5 % у травні до 73 % у серпні, а за умов сухого літа 2002 року до 90%. Було встановлено, що найбільший ступінь ураження рослин у кінці липня-серпні був вірусом жовтяниці цукрових буряків (ВЖЦБ). Динаміку його розвитку на плантаціях наведено на рис.2.

Діагностику вірусів цукрових буряків проводили електронно-мікроскопічним методом. У препаратах виявляли нитковидні вірусні частки розміром - 1200-1300X10-14 нм., що характеризувало ВЖЦБ.

Зараженість цукрових буряків патогенами вірусної природи у відповідності з виявленими симптомами перевіряли за допомогою методу виділення та ідентифікації дЛРНК фітовірусів. Переваги цього методу визначалися надзвичайною чіткістю експерименту, мінімальною кількістю рослинної проби і, практично, стовідсотковою детекцією вірусів у зразку. Була встановлена залежність концентрації нуклеїнової кислоти вірусу відповідно до симптомів уражених рослин. Концентрація рибонуклеїнової

кислоти вірусу визначалася за інтенсивністю фарбування зразку та прояву в променях ультрафіолетового світла. Для гібриду Білоцерківський ЧС 90 найбільша концентрація рибонуклеїнової кислоти відзначалася при симптомі енації та жовтяниці (рис.3, зразок 2). При симптомі потовщення та просвітлення жилок також спостерігалась значна концентрація вірусспецифічної рибонуклеїнової кислоти (рис.3, зразок 4). Для гібриду цукрових буряків Український ЧС70 отримано аналогічні результати, але длРНК виявлена в меншій концентрації. Для обох гібридів симптом мозаїки відмічено як негативний результат. (рис.3, зразок 6). За результатами досліджень із рослин цукрових буряків нами було виділено длРНК фітовірусу, яка мала високе електрофоретичне розподілення і відповідала розміру криптовірусу цукрових буряків (1,6-1,72 кв).

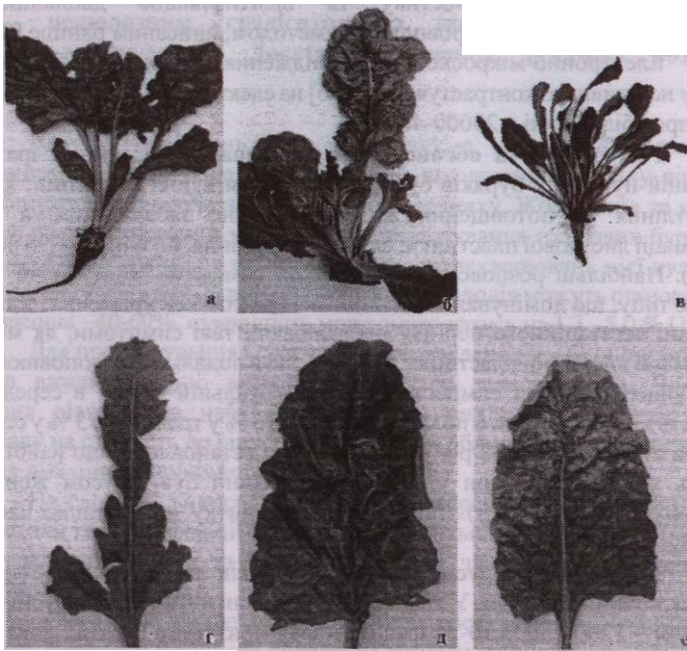


Рис.1. Вірусспецифічні симптоми на рослинах цукрових буряків:

а) мозаїка, гофрування; б) деградація листкової пластинки, гофрування; в) карликовість; г) енації та мозаїка; д) потовщення та просвітлення жилок; е) жовтяниця та точкові некрози.

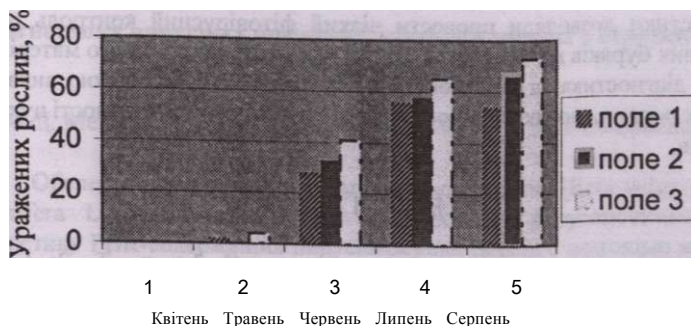
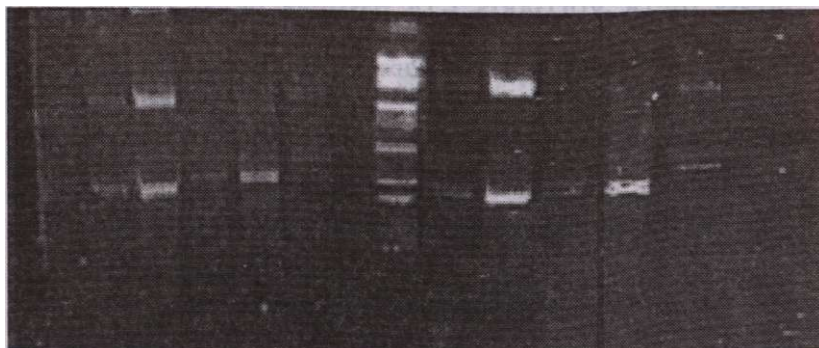


Рис.2. Динаміка розвитку вірозу цукрових буряків залежно від періоду вегетації.

Поле 1-Український ЧС-70; поле 2-Білоцерківський ЧС 90; поле 3-Білоцерківський ЧС 90.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Рис.3. Електрофореграма виділених длРНК з рослин цукрових буряків з вірусоспецифічною симптоматикою гібриду Білоцерківський ЧС 90 (1 - деформація листової пластинки; 2 - енації та жовтяниця; 3 - хлороз; 4 - потовщення та просвітлення жилок; 5 - некроз; 6 - мозаїчність; 7 - молекулярний маркер.), та Український ЧС70 (8 - деформація листової пластинки; 9 - енації та жовтяниця; 10 - хлороз; 11 - потовщення та просвітлення жилок; 12 - некроз; 13 - мозаїчність).

Таким чином, отримані результати щодо виділення та ідентифікації длРНК фітовірусів в комбінації із класичними методами вірусної діагностики дозволяли провести чіткий фітовірусний контроль рослин цукрових буряків на Київщині. Відбір здорового посадкового матеріалу та рання діагностика за допомогою методу длРНК є запорукою виявлення хворих рослин, що, як наслідок, веде до підвищення врожайності цукрових буряків.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Болезни сельскохозяйственных культур: В 3-х т., Т. 2: Болезни технических культур и картофеля / Под ред. В. Ф. Пересыпкина. - К.: Урожай, 1989.—248 с.
2. Киселев Н. А. Электронная микроскопия биологических макромолекул. - М.: Наука, 1965.- 146 с.
3. Мельничук М.Д. Діагностика та ідентифікація РНК-вмісних вірусів рослин на стадії бінарних форм РНК при реплікації в клітині // Бюлетень Інституту сільськогосподарської мікробіології. - 2000. - №8 - С. 13-15.
4. Мельничук М.Д. Ідентифікація моно- та змішаних вірусів цукрового буряку (*BETA VULGARIS L.*)// Науковий Вісник Національного аграрного університету - 2001. - Вип. 40. - С.23-27.
5. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Рижук С.М., Патица В.П., Бойко А.Л. Моніторинг вірусних інфекцій рослин в біоценозах України. - К., - 2001.-220 с.
6. Melnychuk M.D., Martyn G.G., Zheltonogskaya L.V., Smirnova S.O., Kozhukalo V.E. In vitro obtaining and microscopy investigations of virus-free hop (*Humulus lupulus L.*). // International Hop Growers Convention IHGC, Pulawy, Poland, July 27-30, 1999, P 136-137.
7. Morris T.J., Dodds J.A. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus infected plant and fungal tissue // Phytopathol. - 1979. - 69. - P. 854-858.
8. Valverde R.A., Nameth S.T., Jordan R.L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis // Plant Dis. - 1990. -74, № 3. - P. 255-258.

Аннотация

УДК 633.63:578.24

Диагностика вирусных инфекций сахарной свеклы в агроценозах
Украины

М.Д. Мельничук, С.А. Смирнова, Е.В. Качура, А.В. Смирнова

Обследованы агробиоценозы сахарной свеклы (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) Киевской области Украины на вирусоносительство. Диагностику РНК-содержащих вирусов осуществляли с помощью метода электронной микроскопии и хроматографической очистки дцРНК через целлюлозный градиент с дальнейшим проведением электрофореза. Выявлена значительная контаминированность посевов вирусом желтухи сахарной свеклы. Исследована сезонная динамика развития патогена.

Annotation

UDC 633.63:578.24

Diagnostics of virus infections of sugar beet in agrocoenoses of Ukraine

M. Melnychuk, S. Smirnova, E. Kachura, A. Smirnova

Agrocoenoses of the sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) cultivated in the Kyiv district of Ukraine were surveyed for virus infection. Diagnostics of RNA-containing viruses was carried out with the use of a method of electronic microscopy and chromatographic clearing of dsRNA through a cellulose gradient followed by electrophoresis. A significant contamination of the crop by yellows virus of sugar beet was detected. Seasonal dynamics of pathogen development was investigated.