

І.І. Гуляєва¹, О.В. Шевченко², Г.О. Снігур², А.С. Бісов²,
Б.Н. Мілкус¹

¹Одеський державний аграрний університет, вул. Канатна, 99, Одеса, 65039, Україна,
e-mail: ogssi@te.net.ua, inna_gulyaeva@list.ru.

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64,
Київ, 01033, Україна

ПОШИРЕННЯ ВІРУСУ КАРЛИКОВОСТІ ПШЕНИЦІ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ

На посівах пшениці і ячменю південного регіону України виявлено вірус карликовості пшениці (ВКП). Вірус ідентифіковано за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) і полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проаналізовано поширення вірусу, вивчено сортову чутливість злакових культур до ВКП. Показано залежність ступеня ураження рослин вірусом від строків посіву та кліматичних умов.

Ключові слова: вірус карликовості пшениці, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція.

Віруси є однією з серйозних причин зменшення урожайності і якості зерна багатьох сільськогосподарських культур. Віруси є невід'ємною частиною будь-якої екосистеми, причому на різних етапах розвитку віруси знаходяться в тісній взаємодії з різними її компонентами [3].

У зв'язку з великою насиченістю зернових у сівоzmінах в Україні, а саме через короткі паузи при вирощуванні цих культур на одному полі, підвищується інфекційний тиск (навантаження) збудників вірусних хвороб. Внаслідок використання швидкодійних азотних добрив у рослинах підвищується вміст азоту, вільних амінокислот і різних цукрів, що призводить до ураженості зернових попелицями та іншими шкідниками. Це, в свою чергу, сприяє розповсюдженню вірусів зернових культур в агроценозах [6].

Зміни у кліматі, які відбулися за останні роки, зокрема, підвищення континентальності клімату, вимагають поетапного обстеження посівів на наявність шкідливих комах, рослин, уражених різними хворобами, з метою своєчасного застосування заходів захисту від шкочочинних організмів та прогнозування врожайності [3].

ВКП передається персистентно за допомогою унікального вектора — цикадки *Psammotettix alienus*, але не передається цикадками *Javesella pellucid*, *Laodelphax striatellus*, *Macrostoteles laevis*. Вірус зберігається під час линьки та не розмножується в організмі вектора. В процесі



розмноження цикадка не передає вірус своїм нащадкам. ВКП не переноситься механічно, контактом між рослинами, насінням та пилком [3]. Таким чином, епідеміологія ВКП дуже тісно пов'язана з географічним поширенням його унікального вектора, який найбільше розповсюджений у країнах південної та східної Європи: в Болгарії, Чехії, Словаччині, Франції, Угорщині, Німеччині та країнах СНД. Є дані, що його виявили у Швеції. Слід зазначити, що даних щодо поширення вірусу карликовості пшениці в Україні недостатньо.

Нашою метою було не тільки встановити факт наявності вірусу у зразках рослин, але й провести кількісний аналіз для з'ясування поширення даного захворювання на півдні України.

Матеріали та методи

Відбір зразків рослин проводили за результатами візуальної діагностики. Маршрутні обстеження полів здійснювали за певними стандартними схемами (маршрутами), із застосуванням «діагонального» підходу подібно до спрощених схем дрібномасштабного детального моніторингу полів на 10% загальної площі посівів [7].

Відбір зразків зернових злакових культур проводили за вибірковим методом — відбирали рослини із вірусоподібними симптомами: жовтухою та значною карликовістю рослин. Відбирали рослини озимої та ярої пшениці, ячменю, та супутніх дикорослих злаків. На Півдні України зразки відбирали в основних зерносіючих регіонах — Одеська, Херсонська та Миколаївська області. Загалом було відібрано близько 125 зразків.

Після відбору для подальшого аналізу методом ІФА зразки рослин гомогенізували у фосфатному буфері (0,1 М PBS, рН 7.4) у співвідношенні 1:10. Потім центрифугували на центрифугі РС-6 (5000 g протягом 20 хв.); відбирали надосадову рідину, яку використовували для подальших досліджень.

Для діагностики ВКП методом ІФА використовували комерційну тест-систему виробництва LOEWE (Німеччина). Усі зразки аналізували у трикратній повторності відповідно до рекомендацій виробника тест-системи.

Результати реєстрували на аналізаторі ІФА — при довжині хвилі 405 нм. Позитивним рахували показник, який вдвічі перевищував негативний контроль (сік здорової рослини) [1, 2, 6].

Для детекції вірусу карликовості пшениці застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Використовували універсальні видоспецифічні праймери: WDV-forward 468-487 5'-ATCCCGGGTCCTCCGACTAC-3' та WDV-reverse 477-458 5'-GACCCGGGATCGTAAGGGGC-3' [11]. Листки злакових культур (пшениці, ячменю та дикорослих злаків) відбирали з рослин, які при серологічній діагностиці були показані як ВКП-позитивні. Виділення ДНК проводили за рекомендаціями Shepherd et al. [9]. Виділення проводили за допомогою набору Extract-n-Amp™ Plant PCR kit (Sigma, США) за рекомендаціями виробника. Наважку листків (30–50 мг)



переносили в пробірку Еппендорф, вкривали екстрагувальним буфером в об'ємі 50 мкл та нагрівали протягом 10 хв при 95 °С. Надалі додавали буфер для розбавлення в об'ємі 50 мкл, після чого зразок або зберігали при -20 °С, або відразу використовували для проведення ПЛР за стандартною методикою із використанням пари універсальних праймерів. Результати ПЛР слугували підтвердженням дійсного факту інфікування рослин ВКП. Застосування наведених пар праймерів дозволяло ампліфікувати повнорозмірну копію геному вірусу (2700 основ).

Для проведення ПЛР використовували ДНК в об'ємі 3 мкл, виділеної описаним вище способом за допомогою тест-набору. Окрім того, реакційна суміш містила 20 пкмоль праймерів, 200 пкмоль кожного дНТФ, реакційний буфер для ПЛР та 2,5 од/мл Таq-полімерази (Fermentas, Латвія) [9].

Ампліфікацію проводили у режимі: 94 °С — 4 хв. (94 °С — 30 сек., 56 °С — 30 сек., 72 °С — 3 хв. 30 сек.) — 40 циклів, 72 °С — 10 хвилин.

Результати ампліфікації геному вірусу перевіряли методом горизонтального електрофорезу в 1% агарозному гелі [11] за допомогою приладу виробництва «Хійу-Калур» (Латвія) та транслюмінатора (Bio-Rad, США) з використанням стандартних маркерів Gene Ruller 100 bp DNA Ladder plus (Fermentas, Латвія) з подальшим фотографуванням гелів в ультрафіолетовому світлі.

Результати та їх обговорення

За 2009 рік проведено обстеження агроценозів та відбір зразків злакових культурних та дикорослих рослин: пшениці, ячменю та супутніх трав'янистих бур'янів для подальшого виявлення ВКП.

Обстежували рослини з вірусоподібними симптомами: жовтухою та значною карликовістю. Симптоми на рослинах були типовими для ВКП.

Усі відібрані зразки мали особливий інтерес, оскільки в літературі немає статистичних даних стосовно поширення даного вірусу в агроценозах півдня України.

У результаті проведеного дослідження фітосанітарного стану посівів зернових культур показано, що в різних районах півдня України дуже поширеними є симптоми, типові для ВКП — пожовтіння листкових пластинок, затримка росту та карликовість рослин. Звичайно відсоток уражених рослин і ступінь їх ураження були різними. У результаті ІФА вперше діагностовано ВКП в Одеській області на сортах озимої пшениці Селянка, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник, Одеська 267 та на сортах озимого ячменю Метелиця, Абориген, Росава, Основа. У Херсонській і Одеській областях ВКП виявлено на диких злаках (*Deschampsia sp.*). В Миколаївській області ВКП не був виявлений.

Проведеними дослідженнями встановлено значне поширення ВКП у зернових агроценозах деяких районів півдня України.

Результати проведеного аналізу стосовно впливу сортів та строку посіву на прояв ВКП наведені в таблицях 1 та 2.



Таблиця 1
Виявлення ВКП на озимому ячмені в Одеській області за допомогою ІФА

Table 1
Serological detection (ELISA-test) of WDV in the winter barley at the Odesa region

Сорт	Сівалковий посів	
	2.10.08	12.10.08
Росава	–	+
Основа	–	+
Тамань	–	–
Метелиця	+	–
Абориген	+	–

умовні позначення: – вірусу немає; + наявність вірусу

Таблиця 2
Результати виявлення ВКП на озимій пшениці в Одеській області за допомогою ІФА

Table 2
Serological detection (ELISA-test) of WDV in the winter wheat at the Odesa region

Сорти	Строки посіву					
	5.09.08	15.09.08	25.09.08	5.10.08	15.10.08	25.10.08
Одеська 267	–	+	+	–	–	–
Селянка	+	–	–	–	–	–
Кнопа	+	+	–	–	–	–
Знахідка Од.	+	+	–	–	–	–
Куяльник	+	+	+	–	–	–

Аналізуючи дані ІФА, можна зробити висновок про те, що ВКП на озимому ячмені проявлено на таких сортах як Росава, Основа, Метелиця, Абориген. Озимий ячмінь був посіяний звичайними сівалками та у демонстраційному досліді – широкорядним способом посіву. У сівалковому посіві ВКП виявлено на сортах Метелиця та Абориген 2.10.08 строку посіву та Росава і Основа 12.10.08 строку посіву. При широкорядному посіві 12.10.08 ВКП виявлено на сортах Росава і Основа. На сорті Та-



мань ВКП не виявлено взагалі, що ймовірно може свідчити про його несприйнятливості до даного вірусу.

Отримані результати дозволяють зробити висновок про відсутність зв'язку між способом та строком посіву злакових культур і їх ураженістю ВКП. Треба відмітити, що і у виробничих посівах, зокрема у Комінтернівському і Біляївському районах Одеської області, ВКП виявлено на сортах Основа 20.09.08 строку посіву та Росава 2.10.08 строку посіву, відповідно. Отже, основним способом боротьби з ВКП на озимому ячмені має бути вибір стійких сортів. Тим не менше, оскільки ВКП є ДНК-вмісним гемінівірусом, який реплікується в ядрі, пошук сортів злаків, стійких до даного патогену, може виявитися нерентабельним.

Тестування зразків озимої пшениці показало, що на відміну від озимого ячменю, який був уражений в оптимальний для посіву строк (10–15.10), на пшениці ВКП не виявлено за посіву в оптимальний термін. Він виявлявся лише за посіву з 5.09 по 25.09. У зв'язку з цим, важливим є строк посіву культури. Про це свідчать дані таблиці 3, з якої видно, що ВКП ідентифіковано при посіві 5. 09 на сортах Селянка, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник; 15.09 на сортах: Одеська 267, Кнопа, Знахідка Одеська, Куяльник; 25. 09 на сортах: Одеська 267, Куяльник, а за строків посіву 5.10; 15.10; 25.10 ВКП на жодному із вищевказаних сортів виявлено не було. У зв'язку з цим основну увагу необхідно приділяти своєчасному посіву культур (до або після масового лету векторів ВКП) та проведенню агротехнічних заходів з контролю популяцій вектору ВКП. Зокрема, нами було з'ясовано, що значна кількість популяцій вектора ВКП цикадки *Psammotettix alienus*, виявилася нездатною пережити сувору та тривалу зиму 2009 року, тому рівень інфікованості посівів у 2010 р. виявився значно меншим за показники минулих років.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Антитела 1*. Методы /под ред. Кетти Д. — М.:Мир. —1991(а). — С. 68–92.
2. *Антитела 2*. Методы /под ред. Кетти Д. — М.:Мир. — 1991(б). — С. 152–165.
3. *Бойко А.Л.* Влияние факторов внешней среды на вирусы, инфицирующие растения //Сельскохозяйственная биология. — 1989. — № 5. — С. 120–125.
4. *Бойко А.Л.* Экология вирусов растений / К.: Вища школа. — 1990. — 167 с.
5. *Гнутова Р.В.* Серология и иммунохимия вирусов растений / М.: Наука. — 1993. — 301 с.
6. *Защита растений в устойчивых системах землепользования (в 4-х книгах) / Под общей редакцией доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шпаара.* — Минск. — 2004., Книга 4. — 345 с.



7. *Экологизированная* защита растений в овощеводстве, садоводстве и виноградарстве (в двух книгах) / Под общей редакцией доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шпаара. — Санкт-Петербург. — 2005., Книга 1. — 336 с.

8. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis* Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989. 689 p.

9. *Shepherd D., Martin D., Lefevre P., Monjane A., Owor B., Rybicki E., Varsani A.* A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue // *Journal of Virological Methods*. — 2008. — Vol. 149, Issue 1. — P. 97–102.

10. *Tobias I., Kiss B., Bakardjieva N., Palkovics L.* The Nucleotide Sequence of Barley Strain of Wheat Dwarf Virus Isolated in Bulgaria // *Cereal Research Communications*. — 2009. — V.37(2). — P. 237–242.

11. *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* (С.М. Fauquet, М.А. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball (eds)). Academic Press, 2005. 1162 p.

И.И. Гуляева¹, А.В. Шевченко², Г.А. Снигур², А.С. Бисов², Б.Н. Милкус¹

¹Одесский государственный аграрный университет, ул. Канатная, 99, Одеса, 65039, Украина, e-mail: ogsi@te.net.ua, inna_gulyaeva@list.ru.

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, ул. Владимирская, 64, Киев, 01033, Украина

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСА КАРЛИКОВОСТИ ПШЕНИЦЫ НА ЮГЕ УКРАИНЫ

Реферат

На посевах пшеницы и ячменя южного региона Украины выявлен вирус карликовости пшеницы (ВКП). Вирус идентифицирован при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Сделан анализ распространения вируса, изучена сортовая чувствительность злаковых культур к ВКП. Показана зависимость степени поражения растений вирусом от сроков посева и климатических условий.

Ключевые слова: вирус карликовости пшеницы, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция.



**I.I. Guliaeva¹, O.V. Shevchenko², G.O. Snigur², A.S. Bisov²,
B.N. Milkus¹**

¹Odesa Agrarian University, 99, Kanatna str., Odesa, 65039, Ukraine,
e-mail: gulyaeva@list.ru

²T. Shevchenko National University, 64, Volodymirska str., Kyiv, 01033, Ukraine

SPREAD OF WHEAT DWARF VIRUS (WDV) ON THE SOUTH OF UKRAINE

Summary

There were detected the wheat dwarf virus (WDV) on the wheat and barley grown at the South part of Ukraine. The virus identification was conducted by ELISA-test and Polymerase Chain Reaction (PCR). The WDV distribution and cereals varietal resistance to this virus were analyzed. It was established that the level of WDV infection depends on the time of crops sowing and the climatic conditions.

Key words: wheat dwarf virus, ELISA-test, Polymerase Chain Reaction.

