

**ВИКОРИСТАННЯ ДІАГНОСТИЧНИХ МЕТОДІВ ДЛЯ
ВИЯВЛЕННЯ СТУПЕНЯ УРАЖЕННЯ СОРТІВ ПЕРСИКА
ВІРУСОМ ШАРКИ СЛИВИ (*PLUM POX POTYVIRUS*)**

С. Мартинов¹, О. Митрофанова¹, І. Митрофанова^{1,2}

¹Нікитський ботанічний сад – Національний науковий центр НААН України
Ялта, смт Нікіта 98648, АР Крим, Україна
e-mail: in_vitro@ukr.net

²Навчально-науковий центр біології і екології субтропічних рослин та
ландшафтознавства НУБіП України
Ялта, смт Нікіта 98648, АР Крим, Україна
e-mail: nikita@naui.kiev.ua

Проведено скринінг ураженості вірусом шарки сливи (*Plum pox potyvirus*, PPV) сортів персика на півдні та південному сході України і знайдено 4 осередки ураження, які ліквідовані. В оцінюванні ураженості вірусом PPV рослин персика показано ефективність застосування комплексу діагностичних методів: рослин-індикаторів, системи Піротест-ІФА, імунохроматографічного аналізу (тест-смужки), відбору толерантних і вірусостійких сортів із виявленням стероїдних глікозидів в органах і тканинах рослин методом тонкошарової хроматографії.

Ключові слова: персик, вірус шарки сливи, PPV, система Піротест-ІФА, імунохроматографічний аналіз, стероїдні глікозиди.

Кліматичні умови півдня України дають змогу вирощувати цінні плодові культури. Однією з них є персик (*Prunus persica* (L.) Batsch). Серед відомих і найбільш шкідливих вірусних захворювань персика найнебезпечнішою є шарка сливи, яка спричиняється *Plum pox potyvirus* (PPV, рід *Potyvirus*, родина *Potyviriidae*). В Україні це захворювання було зареєстроване 1966 року в Чернівецькій області [5]. Воно викликає зниження врожаю до 70–100% у вразливих сортів і загибель сильно уражених, особливо молодих дерев [8, 9]. У разі тотального зараження вірусом промислових і колекційних насаджень персика необхідне оздоровлення сортів і отримання безвірусного садивного матеріалу [4].

Метою цього дослідження було виявити ступінь ураження сортів персика вірусом шарки сливи на півдні України із застосуванням комплексу діагностичних методів.

Матеріали та методи

Об'єктами досліджень були уражені та неурражені вірусом шарки сливи (PPV) сорти персика. Скринінг на виявлення осередків ураження проводили під час експедиційного обстеження (березень-червень, серпень-вересень) колекційних і промислових насаджень Ялтинського, Бахчисарайського і Севастопольського районів АР Крим, а також Нікопольського району Дніпропетровської області. У роботі використано як загальноприйняті методи вірусологічних досліджень [1], так і розроблені або модифіковані нами стосовно конкретної мети і завдань дослідів [3, 4].

Тестування на віруси вихідного матеріалу виконували з використанням рослин-індикаторів (*Chenopodium foetidum* Schrad, *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* A.Gray та дерев'янистих індикаторів *Prunus tomentosa* Thunb, *P. persica* (L.) Batsch 'Elberta'), імуноферментного аналізу (DAS ELISA-test). Поряд із тим, для ідентифікації

вірусу шарки сливи застосовували молекулярно-біологічні методи – систему Піротест-ІФА («Иммунотех», Росія) [7] та імунохроматографічний аналіз (ІХА), розроблений фахівцями МДУ (м. Москва, Росія) і вдосконалений за нашою участю [6].

Оцінку сортів персика на вразливість щодо вірусу шарки сливи здійснювали за вмістом стероїдних глікозидів у деревині, корі, бруньках і листках (у зимовий, весняний, літній періоди). Принцип використання стероїдних глікозидів для оцінювання стійких чи толерантних сортів кісточкових плодівих культур ґрунтується на тому, що стероїдні глікозиди можуть слугувати маркером вірусостійкості завдяки своїм антиоксидантним властивостям і здатні стимулювати захисні реакції рослини-живителя, індуючи в неї стійкість [2]. Вміст глікозидів в органах рослин, уражених вірусом шарки сливи, визначали методом тонкошарової хроматографії та оцінювали на хроматограмі за наявністю плям жовтого або морквяного кольору. Візуальне оцінювання сортів персика на толерантність щодо вірусу шарки проводили в період появи симптомів на листках (травень-червень, серпень-вересень). При цьому враховували не лише симптоми ураження вірусом РРV, а й зовнішні ознаки хвороб (міжжилковий хлороз, хлоротичну мозаїку листків, вирости на плодах), спричинених іншими вірусами – некротичною кільцевою плямистістю (*Prunus necrotic ringspot virus*), карликовістю сливи (*Prune dwarf virus*) та ін.

Результати і їхнє обговорення

У результаті виконаних польових досліджень визначені оптимальні строки виявлення зовнішніх ознак хвороби та добору сортозразків – квітень-червень, серпень-вересень. Виявлені й описані найхарактерніші зовнішні ознаки хвороби шарки сливи на різних сортозразках персика, що дає змогу вчасно виявити осередки вірусу РРV: на пелюстках квіток утворюються малинові штрихи і плями (рис. 1); на листках – дуги й кільця вздовж центральної та бічних жилок; на зелених плодах – хлоротичні плями й кільця; на стиглих плодах – червоні кільця, а також злиті бузково-червоні плями або великі кільця з блідо-рожево-червоним центром, кісточка деформовані. Наприклад, у сортів Достойний, Золота Москва на листках виявлені хлоротичні плями, дуги й кільця вздовж центральної та бічних жилок; на зелених плодах – хлоротичні плями й кільця; на стиглих плодах – червоні кільця, яскраві злиті бузково-червоні плями або великі кільця з рожевим центром (рис. 2). У сортів Золота Москва і Темісовський кісточка часто були деформовані.



Рис. 1. Характерні симптоми прояву хвороби, спричиненої вірусом шарки сливи (РРV) на квітках персика.

У зв'язку з недостатньо вивченою етіологією захворювання та необхідністю ранньої діагностики захворювання, спричиненого вірусом шарки сливи (*Plum pox potyvirus*), було вдосконалено методи тестування та діагностування цієї хвороби. Для попередньої ідентифікації та вивчення біологічних властивостей вірусу використовували рослини-індикатори. Так, на *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana clevelandii*, *N. benthamiana*, *Prunus tomentosa*, *P. persica* 'Elberta' протестовано 562 сортозразки персика, з яких 384 виявилися інфікованими РРV.



Рис. 2. Листки (зліва) та плоди персика (справа), уражені вірусом PPV.

З табл. 1 видно, що досліджувані сорти персика в колекційних і селекційних насадженнях Ялтинського та Севастопольського районів АР Крим були різною мірою інфіковані вірусом шарки сливи. Наприклад, у сорту Пам'ятний Нікітський кількість уражених дерев становила 38,5%, а у сорту Золота Москва – 78,4%. При цьому у сильно уражених сортів Достойний, Золота Москва, Темісовський виявлено високий вміст вірусу в клітинному соці тестованих зразків (+++).

Таблиця 1

Результати візуального обстеження й тестування на ураженість вірусом шарки сливи сортів персика в колекційних і селекційних насадженнях Ялтинського та Севастопольського районів АР Крим

№ з/п	Сорт	К-сть обстежених дерев	Симптоми прояву PPV, зафіксовані під час вірусологічного обстеження	Оцінка вмісту PPV в клітинному соці тестованого зразка*	Відсоток уражених дерев
1	Гармонія	15	Хлоротичні кільця, лінії на листках, деформація листової пластинки	++	60,3
2	Гранатовий	11	Хлоротичні дуги та лінії на листках, кільця на плодах	++	56,5
3	Достойний	12	Кільця й дуги на листках, на плодах яскраво-червоні плями та кільця	+++	48,9
4	Золота Москва	16	Яскраво забарвлені плями та червоні кільця на плодах, хлоротичні кільця й плями на листках	+++	78,4
5	Лакомий	11	Дрібні хлоротичні плями та дуги на листках	+	43,9
6	Любимий	11	Дрібні хлоротичні плями та слабовиражені дуги на листках	+	52,6
7	Мечта	2	Міжжилковий хлороз	0	0
8	Нарядний	12	Міжжилковий хлороз, дрібні хлоротичні плями на листках	++	61,2
9	Пам'ятний	12	Міжжилковий хлороз, хлоротичні плями та дуги на листках	+	38,5
10	Советський	11	Дрібні хлоротичні кільця на листках	++	41,2
11	Темісовський	11	Хлоротичні плями на листках, деформація листової пластинки, камедь і виразки на пагонах	+++	65,8

Примітка. * 0 – вірус відсутній; +++ – висока концентрація вірусу в клітинному соці; ++ – середня концентрація вірусу в клітинному соці; + – низька концентрація вірусу в клітинному соці.

Результати тестування сортозразків персика з промислових насаджень Нікопольського району Дніпропетровської області засвідчили, що серед усіх обстежених дерев 11 сортів вірус шарки сливи було виявлено у 6 сортів з низьким і середнім вмістом вірусу в клітинному соці (табл. 2).

Таблиця 2

Результати візуального обстеження й тестування на ураженість вірусом шарки сливи сортів персика з промислових насаджень Нікопольського району Дніпропетровської області

№ з/п	Сорт	К-сть обстежених дерев, шт.	Симптоми прояву PPV, зафіксовані під час вірусологічного обстеження	Оцінка вмісту PPV в клітинному соку тестованого зразка*	Відсоток уражених дерев
1	Гармонія	168	Дрібні хлоротичні плями та слабовиражені дуги на листках	+	9,7
2	Гранатовий	157	Посвітління жилок листка, деформація листової пластинки	++	14,8
3	Достойний	98	Дрібні хлоротичні плями на листках	++	17,1
4	Золота Москва	112	Хлоротичні плями на листках, дуги, лінії та кільця на листках, деформація листової пластинки, кільця й плями на плодах	++	28,9
5	Лакомий	106	Без симптомів	0	0
6	Любимий	98	Дуги на листках, деформація листової пластинки	+	8,6
7	Мечта	133	Міжжилковий хлороз	0	0
8	Нарядний	110	Без симптомів	0	0
9	Нікітський	141	Без симптомів	0	0
9	Памятний	141	Без симптомів	0	0
9	Нікітський	141	Без симптомів	0	0
10	Орфей	139	Хлоротичні плями на листках, дуги, деформація листової пластинки	+++	30,4
11	Темісовський	96	Дуги, стягненість листової пластинки	0	0

Примітка. * 0 – вірус відсутній; +++ – висока концентрація вірусу в клітинному соці; ++ – середня концентрація вірусу в клітинному соці; + – низька концентрація вірусу в клітинному соці.

Унаслідок оцінки стану ураженості персика в промислових насадженнях Бахчисарайського району, де здебільшого зосереджені сорти закордонної селекції, нами відзначено високий ступінь зараженості дерев вірусом шарки сливи. Найсильніше ураженими виявилися дерева сортів O'Henry, Rita Star, Maria Aurally і Sirio (табл. 3).

Таким чином, із проаналізованих 1500 сортозразків ступінь ураженості PPV становив 32,5%.

У результаті проведених лабораторних досліджень нами було з'ясовано, що найефективнішим є застосування системного підходу до виявлення й ідентифікації вірусу шарки сливи із використанням методів Піротест-ІФА (рис. 3) та імунохроматографічного аналізу (ІХА). При проведенні діагностування й тестування рослин на наявність вірусу шарки сливи у них за польових умов ефективним і високочутливим виявився експрес-метод імунохроматографічного аналізу в пористих мембранах (тест-смужках), на які були нанесені антитіла та їхні кон'югати із забарвленими колоїдними частинками, здатними взаємодіяти з PPV. Система Піротест-ІФА та ІХА, порівняно з іншими методами

ідентифікації вірусу шарки в певному сорті, виявилася швидкою та ефективною, що дало змогу визначити мінімальні концентрації PPV у сортозразках (10–50 нг/мл).

Таблиця 3

Результати візуального обстеження й тестування на ураженість вірусом шарки сливи сортів персика з промислових насаджень Бахчисарайського району АР Крим

№ з/п	Сорт	К-сть обстежених дерев, шт.	Симптоми прояву PPV, зафіксовані під час вірусологічного обстеження	Оцінка вмісту PPV в клітинному соці тестованого зразка*	Відсоток уражених дерев
1	Francoise	551	Міжжилковий хлороз	0	0
2	Kevina	545	Хлоротичні плями й дуги на листках, дрібно-, вузьколистість	+	1,0
3	Maria Aurally	226	Хлоротичні дуги й кільця, стягненість листкової пластинки	++	43,0
4	O'Henry	814	Хлоротичні плями й дуги на листках, посвітління жилок листка	+++	48,2
5	Rita Star	1058	Хлоротичні кільця й плями на листках, дуболистий візерунок (аналогічні симптоми виявлені на дикорослих рослинах дурману, які виростають у міжрядді)	+++	68,9
6	Royal Estate	245	Хлоротичні кільця на листках, дуболистий візерунок	+++	38,1
7	Silver Gigant	247	Хлоротичні кільця на листках, деформація листкової пластинки, посвітління жилок листка	++	22,0
8	Vistarich	308	Хлоротичні плями й дуги на листках	+	17,1
9	Sirio	198	Хлоротичні дуги й плями на листках, деформація листкової пластинки	+++	37,1
10	Royal Pride	250	Злиті хлоротичні плями, дрібнолистість	+	24,8

Примітка. *) 0 – вірус відсутній; +++ – висока концентрація вірусу в клітинному соці; ++ – середня концентрація вірусу в клітинному соці; + – низька концентрація вірусу в клітинному соці.

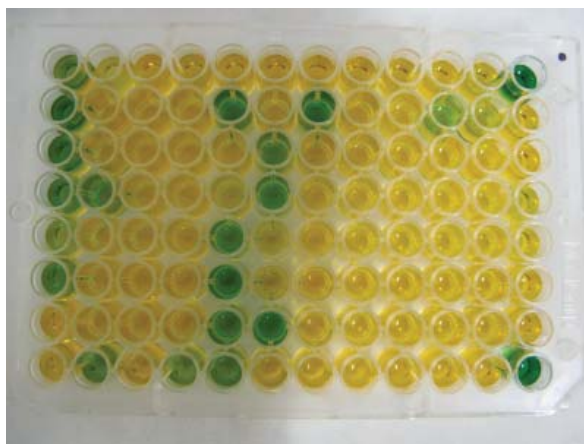


Рис. 3. Діагностування PPV на персику сортів Золота Москва, Пам'ятний Нікітський та ін. методом системи Піротест-ІФА: 1 – позитивна реакція (світлозабарвлена лунка) та 2 – негативна реакція (темнозабарвлена лунка) на PPV.

Як метод діагностування стійкості проти вірусу PPV було використано метод аналізу вмісту стероїдних глікозидів (СГ), які, як відомо, завдяки антиоксидантним властивостям здатні стимулювати захисні реакції рослини-господаря, індукуючи у неї стійкість проти вірусів [2, 3]. Вихідною сировиною для отримання стероїдних глікозидів слугували деревина, кора та бруньки (листки) у двох фазах: зимового спокою і весняного відростання пагонів дерев із різним ступенем ураженості та сприйнятливості щодо вірусу шарки сливи. Локалізацію PPV визначали із застосуванням системи Піротест-ІФА.

Таблиця 4

Результати вивчення локалізації вірусу шарки сливи та стероїдних глікозидів (СГ) у сорторізках персика

№ з/п	Сорторізок	Локалізація PPV *		Локалізація СГ **
		плоди	листки (бруньки)	листки (бруньки)
1	Гранатовий	++	+++	+
2	Достойний	+	+	+
3	Золота Москва	++	+++	0
4	Лакомий	0	+	++
5	Любимий	+	+	++
6	Мечта	+	0	++
7	Нарядний Нікітський	+	++	+
8	Нікітський Подарок	0	0	0
9	Пам'ятний Нікітський	0	++	+
10	Понтійський	++	+++	0
11	Темісовський	+	+++	0
12	Сопрано	0	0	0
13	Loadel	0	0	0
14	Sweet Cap	0	0	0

Примітка. * (0) – вірус відсутній; + – низька концентрація вірусу в клітинному соці; ++ – середня концентрація вірусу; +++ – висока концентрація вірусу; ** (0) – СГ не виявлені; (+, ++) – СГ виявлені.

Як видно з табл. 4, локалізацію вірусу шарки сливи відзначено у вегетативних бруньках, листках і плодах персика. Стероїдні глікозиди виявлені нами в листках і бруньках сортів Гранатовий, Лакомий, Любимий, Мечта, Нарядний Нікітський, Пам'ятний Нікітський. Відомо, що СГ починають виявляти активність у період проникнення й розповсюдження PPV у рослині, тому вони можуть витрачатися на захист рослини-живителя від патогена [3]. Внаслідок проведених досліджень виділено 4 толерантних сорти персика: Нікітський Подарок, Сопрано, Loadel, Sweet Cap.

Таким чином, обстежено 5924 дерев 22 сортів персика на виявлення та поширення вірусу шарки (*Plum pox virus* – PPV) як одного з найнебезпечніших захворювань кісточкових плодових культур, вирощуваних у промислових і колекційних насадженнях. Показано ефективність в оцінюванні зараженості вірусом рослин персика застосування комплексу діагностичних методів: рослин-індикаторів, системи Піротест-ІФА, імунохроматографічного аналізу (тест-смужки), відбору толерантних і вірусостійких сортів із виявленням стероїдних глікозидів в органах і тканинах рослин за допомогою методу тонкошарової хроматографії. Проведено скринінг ураженості сортів персика вірусом шарки сливи (*Plum pox potyvirus*, PPV) на півдні та південному сході України і виявлено 4 осередки ураження в Бахчисарайському, Севастопольському, Ялтинському районах АР Крим та Нікопольському районі Дніпропетровської області, які ліквідовано.

Роботу виконано в рамках проектів НААН (№ 09.02/016) і НУБіП України (№ 110/420-пр).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штиинца, 1985. 311 с.
2. Кинтя П. К., Лазурьевский Г. В., Балашова Н. Н. и др. Строение и биологическая активность стероидных гликозидов ряда спиростана и фуростана. Кишинев: Штиинца, 1987. 142 с.
3. Митрофанова О. В., Митрофанова И. В., Чирков С. Н. и др. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур // Сб. науч. трудов Никит. бот. сада. 2009. Т. 131. С. 94–103.
4. Митрофанова О. В., Славгородская-Курпиева Л. Е., Митрофанова И. В., Лукичѐва Л. А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приѐмы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. Ялта: Крымпресс, 2000. 45 с.
5. Пискун Н. И. «Шарка» слив на Украине // Защита растений. 1969. № 6. С. 54.
6. Чирков С. Н., Бызова Н. А., Шевелева А. А. и др. Испытание отечественных иммунохроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // Сельскохозяйственная биология. 2012. № 1. С. 110–116.
7. Чирков С. Н., Приходько Ю. Н. Пиротест – новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: междунар. науч.-практ. конф. (Москва, 2001). С. 71–72.
8. Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2006. 36. P. 202–204.
9. Spiegel S., Kovalenko E., Varga A., James D. Detection and partial molecular characterization of two *Plum pox virus* isolates from plum and wild apricot in southeast Kazakhstan // Plant Disease. 2004. Vol. 88. P. 973–979.

Стаття: надійшла до редакції 01.03.13

доопрацьована 08.05.13

прийнята до друку 16.05.13

USING THE DIAGNOSTIC METHODS TO IDENTIFY THE INFECTION DEGREE
OF PEACH CULTIVARS BY *PLUM POX POTYVIRUS*

S. Martinov¹, O. Mitrofanova¹, I. Mitrofanova^{1,2}

¹Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Centre NAAS of Ukraine
98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita
e-mail: in_vitro@ukr.net

²Educational Scientific Center of Biology and Ecology of Subtropical Plants and
Landscape Management of NULES of Ukraine
98648, Ukraine, Crimea, Yalta, Nikita
e-mail: nikita@nauu.kiev.ua

The screening of infection degree of peach cultivars caused by *Plum pox potyvirus* (PPV) in the South and South-East of Ukraine has been carried out. Four areas infected by *Plum pox potyvirus* have been revealed and liquidated. The efficiency of complex using

of diagnostic methods for evaluation of PPV infection degree of peach cultivars has been shown: indicator plants, Pirotest-ELISA system, immunochromatographic analysis (test strip), selection of tolerant and virus resistance cultivars with detection of steroid glycosides in organs and tissues of plants by the method of thin-layer chromatography.

Keywords: peach, plum pox potyvirus, PPV, Pirotest-ELISA system, immunoassay analysis, steroid glycosides.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ПОРАЖАЕМОСТИ СОРТОВ ПЕРСИКА ВИРУСОМ ШАРКИ СЛИВЫ (*PLUM POX POTYVIRUS*)

С. Маргынов¹, О. Митрофанова¹, И. Митрофанова^{1,2}

*Никитский ботанический сад
Национальный научный центр,
НААН Украины*

*Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина
e-mail: in_vitro@ukr.net*

*Учебно-научный центр биологии и экологии субтропических растений и
ландшафтоведения НУБиП Украины*

*Ялта, пгт Никита 98648, АР Крым, Украина
e-mail: nikita@naui.kiev.ua*

Проведен скрининг поражаемости сортов персика вирусом шарки сливы (*Plum pox potyvirus*, PPV) на юге и юго-востоке Украины и найдено 4 очага поражения, которые ликвидированы. Показана эффективность применения комплекса диагностических методов в оценке зараженности вирусом сортов персика: растений-индикаторов, системы Пиротест-ИФА, иммунохроматографического анализа (тест-полоски), отбора толерантных и вирусоустойчивых сортов с выявлением стероидных гликозидов в органах и тканях растений методом тонкослойной хроматографии.

Ключевые слова: персик, вирус шарки сливы, PPV, система Пиротест-ИФА, иммунохроматографический анализ, стероидные гликозиды.