

**ПРОУЧВАНЕТО НА ВИРУСНИТЕ БОЛЕСТИ
ЖЪЛТО ЕЧЕМИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (BARLEY YELLOW DWARF, BYDV)
И ПШЕНИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (WHEAT DWARF, WDV)
В СИСТЕМАТА НА ФИТОСАНИТАРНИЯ КОНТРОЛ В БЪЛГАРИЯ**

Нонка Бакърджијева, Антоний Стоев
Институт за защита на растенията, Костинброд

Резюме

Бакърджијева, Н., А. Стоев, 2006. Проучването на вирусните болести жълто ечемичено вджуджаване (Barley Yellow Dwarf, BYDV) и пшенично вджуджаване (Wheat Dwarf, WDV) в системата на фитосанитарния контрол в България

Ретроспективният анализ на данните за синдрома на вирусното вджуджаване по пшеницата и ечемика в България очертава насоките за усъвършенстване на фитосанитарния контрол при посочените култури, както следва: щамово разграничаване на патогените barley yellow dwarf virus и wheat dwarf virus; определяне на видовия състав и проследяване на популационната динамика на насекомите, пренасящи вирусната инфекция; характеризиране на производствените сортове според тяхната реакция в случай на вирусна инфекция.

Ключови думи: Ечемик – Пшеница – Вджуджаване - Вирус

Abstract

Bakardjieva, N., A. Stoev, 2006. Research work on the viral diseases Barley Yellow Dwarf Virus /BYDV/ and Wheat Dwarf Virus /WDV/ in the system of the phytosanitary control in Bulgaria

The retrospective analysis based on the data for the wheat and barley dwarf syndrome in Bulgaria traces out the directions for improvement of the phytosanitary control on the agricultural plants mentioned above. The directions are the following: strain differentiation of the pathogens barley yellow dwarf virus and wheat dwarf virus; determination of the insect species transmitting the infection and monitoring of the movement of the insect population; characterization of the wheat and barley production varieties according to their reaction in the case of viral infection.

Key words: Barley – Wheat – Dwarfing - Virus

УВОД

Проучванията на вирусните болести по пшеницата и ечемика в България, осъществени през втората половина на миналия век и началото на настоящия, показват, че стопански важни за страната са жълтото ечемичено вджуджаване (barley yellow dwarf virus, BYDV - luteovirus) и пшениченото вджуджаване (wheat dwarf virus, WDV - geminivirus). В години, когато условията са благоприятни за

разпространяването на посочните патогени, вджуджаването по житните има характер на епифитотия. Болните растения могат да загинат преждевременно, без да образуват възпроизводствените си органи, а дори и да изкласят, семената са с лошо качество като суровина за преработка и като фураж.

Специалистите у нас познават условията за появата и разпространяването на причинителите на вджуджаването. Това позволява на стопаните да бъде препоръчана система от предпазни мерки срещу посочения синдром. Развитието на българското земеделие налага тази система да бъде допълвана и усъвършенствана. Систематизирането на данните за фитосанитарната обстановка стои в основата на стратегията за контрол на вирусните болести по житните култури у нас.

ПРОБЛЕМИ В ПРОУЧВАНЕТО НА ЖЪЛТОТО ЕЧЕМИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (BYDV) И ПШЕНИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (WDV)

Синдромът е познат на стопаните и учените още в началото на миналия век, но неговата вирусна етиология е изяснена доста късно (по Ковачевски и др. 1977). Причина за закъсняването е липсата на средства, позволяващи прилагането на диагностичните методи, отговарящи на особеностите на вирусните патогени.

Методичните основи за проучването на стопански важните вирусни заболявания у нас са поставени от Атанасов и Додов (1961), Димов и Стефанов (1975), Стефанов и Димов (1981). Идентифицирането на вирусните патогени по житните у нас започва с усвояването и прилагането на метода на електронната микроскопия, чрез която е наблюдаван вирусът на пшеничената щрихова мозайка – wheat streak mosaic virus - WSkMV (Марков и др., 1975). По-късно с помощта на серодиагностиката, усъвършенствана чрез маркиране на антителата с ензими (double antibody sandwich - enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA), са доказани BYDV (Clark & Adams, 1977, Baskardjieva et al., 1994) и WDV (Бакърджиева, 1998).

Наред със серологичната диагностиката на вирусите продължава проучването на имунния отговор на житните растения в случай на вирусна инфекция. Разработени са примерни скали за отчитане на реакцията на инфектираните растения (Stoev & Baskardjieva, 2005). Съпоставянето на данните от проведените ELISA тестове и състоянието на растенията при доказана вирусна инфекция прави възможно осъществяването на т. нар. скрининг – метод за проследяване на фитосанитарната обстановка при посочените култури. Пълноценното прилагане на метода изисква още: щамово разграничаване на вирусните патогени, определяне на видовия състав и проследяване на популационната динамика на насекомите, известни като преносители на вирусите. Внимание трябва да бъде отделено и на агротехническите мероприятия (Ковачевски и др., 1977; 1995).

НАСОКИ ЗА ПРОУЧВАНЕТО НА ЖЪЛТОТО ЕЧЕМИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (BYDV) И ПШЕНИЧЕНО ВДЖУДЖАВАНЕ (WDV).

Диагностика и щамова характеристика на вирусните патогени

От специализираните източници е известно, че причинителите на жълтото ечемичено вджуджаване са обособени в зависимост от:

- вида на листните въшки, явяващи се като преносители (вектори) на заразата;
- вида на възприемащите заразата растения (кръга от гостоприемници) и вирулентността на причинителите;
- наличието на т. нар. кръстосана защита, явяваща се при смесени инфекции;
- серологичните свойства на вирусните изолати;
- нуклеиновата последователност във вирусния геном.

От практическа гледна точка заслужава внимание подходът за разграничаването според вида на преносителя и вирулентността спрямо реакцията на овес. Rochov (1969) и Gill (1969) разглеждат взаимоотношенията между вируса и вектора като относително постоянни (по Martin & D'Arcy 1995). Това дава възможност

класификацията да стане по биологични свойства (табл. 1).

Таблица 1. Биологични свойства на щамове на BYDV
(взаимодействие вирус - вектор)

Щам	Преносител	Вирулетност
RMV	<i>Rhopalosiphum maidis</i>	Слаба
RPV	<i>R. padi</i>	Слаба
MAV	<i>Macrosiphum avenae</i>	Умерена
PAV	<i>R. padi, M. avenae</i>	Силна
SGV	<i>Schizaphis graminum</i>	Слаба

Резултатите от проучванията на серологичните свойства и нуклеиновата последователност на BYDV показват щамово обособяване, както и родство с вируса на западната жълтеница по цвеклото (beat western yellows virus) (Gill & Chong, 1979; Rochow & Carmichael, 1979; Vincent et al., 1991).

Имуноензимният метод, използван в електронната микроскопия (ISEM), и за тестова реакция върху задържащи антителата носители (ELISA), е подходящ за откриването на вирусите направо в растителния сок, както и за установяване на родство между тях. Основни диагностични реагенти са антителата, получени като имунен отговор на топлокръвни животни срещу определени щамове PAV, MAV и RPV (Rochow & Duffus, 1978; Lister & Sward, 1988; Pead & Torrance, 1988; D'Arcy et al., 1990; Martin & D'Arcy, 1990). Количеството и качеството на пречистения вирусен препарат за инжектиране на топлокръвните зависят от: избора на растението – гостоприемник, осигуряването на условия за размножаването на вируса, методиката за извличането на вируса от флоемната тъкан и от запазването му в процеса на пречистване.

Намножаването на BYDV става в пшеница, ечемик и др. видове от сем. Житни (*Gramineae*), отглеждани в култивационни съоръжения (растежни камери) при температура 15 - 25°C и фотопериод около 15 часа. Заразяването на растенията става във фаза 1 – 2 лист с вирофорни въшки. След седмица за унищожаване на въшките трябва да бъде направено фумигиране или пръскане с инсектициди.

Вирусите могат да бъдат пречистени от надземната маса и от корените. В някои случаи корените дори са по-добър източник за пречистване. Събраната растителна маса от порядъка на няколко килограма може да бъде съхранявана при минус 20°C, без това да разрушава вируса. Извличането (екстрахирането) на последния става по сложна процедура, включваща: охлаждане на растителната тъкан до минус 70°C в баня от сух лед или течен азот, смилане в екстрахиращ буфер, грубо отделяне на растителните съставки (т. нар. проясняване) с помощта на хлороформ, поетапно центрофугиране, включващо захарозен градиент, и концентрация на образувалите се фракции (зони). Вирионите на BYDV са изометрични с диаметър около 26 nm. Те съдържат РНК (Domier, 1995; Hewings, 1995).

Вирусът на пшениченото вджуджаване WDV може да бъде пренесен от инфектирани в естествени условия растения на здрави посредством цикади от вида *Psammotettix alienus*. За целта насекомите трябва да се хранят от инфекциозния източник 4 дни, след което да бъдат оставени за 7 дни на здравите растения. При доказано инфектиране на последните те трябва да бъдат пренесени във вегетационната къща, за да може при контролирани условия концентрацията на вируса в растителната тъкан да стане по-висока.

Пречистването може да започне от 200 g листна маса, предварително замразена до - 70°C. Стриването на растителната тъкан става в течен азот, а вирусната екстракция – в две части натриевофосфатен буфер, съдържащ аскорбинова киселина, меркапто-етанол, етилендиаминтетраацетат и тиогликолова киселина.

Пречистеният препарат след предварително емулгиране може да бъде

инжектиран на зайци с цел получаване на антисерум необходим за диагностика на вируса (Bistray & Gborjanyi, 1996). Вирионите на WDV са продълговати с дължина 30 nm и диаметър 18 nm. Профилът им е ъловат. Съдържат ДНК (Lindsten, 1991).

Освен серологичните методи за диагностика на растителните вируси в т. ч. и за причинителите на вджуджаването приложение намират методите, основани на хибридизацията на нуклеиновите киселини. Реакцията може да протече върху нитроцелулозна или найлонова мембрана. Формират се комплекси между РНК или ДНК на патогена и т. нар. комплементарна (допълваща) РНК или ДНК-проба, която е маркирана по специален начин.

Друг метод е полимеразно-верижната реакция (PCR), чрез която теоретично може да бъде определена дори една молекула ДНК в смес с други нуклеинови киселини. Методът е подходящ за специфичното проследяване на определен участък от нуклеиновата киселина. За целта служат синтетични олигонуклеотидни образци (праймери).

PCR може да послужи за специфично определяне на вирусна РНК. При това посредством ензима обратна транскриптаза се стига до получаването на комплементарна ДНК (по French, 1995).

Методи и средства за контрол на вирусното вджуджаване по житните.

Липсата на препарати с терапевтично действие, приложими в полски условия срещу вирусното вджуджаване по житните, налага система за фитосанитарен контрол, основана на скъсяването на периода, през който младите растения са застрашени от заразяване, и на борбата с преносителите на заразата. Употребата на инсектициди е съобразена с местния опит. Ориентири за пръскане са датата на сеитба и фенофазата на растенията. Критичен е периодът преди братенето, когато растенията са практически уязвими от инфекцията (т. е. вредата е по-голяма) (Димов & Стефанов, 1975; Ковачевски и др., 1995; Plumb & Johnstone, 1995).

Друго направление е използването на устойчиви или толерантни към вирусните патогени сортове (Павлов, 1965; Habekuss & Lehman, 1991; Habekuss, 1994; Scheurer et al., 2000), създадени от изследователски екипи, включващи селекционери, ентомолози и вирусолози. Задачите на специалистите могат да бъдат разпределени, както следва:

- селекционери - подаване на материали за изпитване и оценка на тяхната реакция към вирусните патогени;
- ентомолози – определяне на вида на преносителите и на методите за осъществяване на вирусната инфекция;
- вирусолози - идентифициране и щамово разграничаване на вирусите, поддържане на източници на инфекция, контрол на вирофорността на преносителите.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Щамовото характеризане на установените у нас стопански важни вирусни патогени по житните е необходимо за развитието на диагностиката на вирусните болести и сортоизпитването за устойчивост към вирусни инфекции.

Оптимизирането на системата за контрол налага детайлно проучване на видовия състав и популационната динамика както на преносителите на вирусни болести в житните посеви, така и на хищниците и паразитите, нападащи преносителите. Допълването на знанията в това направление ще подпомогнат създаването на прогностични модели с практическо приложение за намаляването на употребата на инсектициди.

ЛИТЕРАТУРА

- Атанасов, Д., Д. Додов, 1961.** Вирусни болести по житните. Растителна защита 2: 13 – 19.
- Бакърджиева, Н., 1998.** Вирусологичен скрининг на житни посеви в България. Ninth congress of the Bulgarian microbiologists with foreign participation – proceedings, 2, 531 – 534.
- Димов, А., Й. Стефанов, 1975.** Зависимост между сроковете на сеитба и нападението на пшеницата от вирусни болести. Растителна защита 11: 31 – 33.
- Ковачевски, И., Д. Трифонов, М. Марков, М. Янкулова, 1977.** Вирусни и микоплазмени болести по културните растения, ЗЕМИЗДАТ, София.
- Ковачевски, И., М. Марков, М. Янкулова, Д. Трифонов, Д. Стоянов, В. Качармазов, 1995.** Вирусни и вирусоподобни болести на културните растения. PSSA, София.
- Марков, М., П. Кайтазова, Й. Стефанов, 1975.** Идентифициране на вируса на пшеничената щрихова мозайка в България. Растениев. науки 12 (8): 130 – 137.
- Павлов, П., 1965.** Някои наблюдения върху червения и жълтия пригор по пшеницата. Растениев. науки 2 (1): 159 - 164.
- Стефанов, Й., А. Димов, 1981.** Болестта вджуджаване по пшеницата в България, Растениев. науки 18 (4): 124 – 127.
- Backardjieva, N., V. Kondakova, and A. Stoev, 1994.** Detection of the barley yellow dwarf virus through DAS-ELISA. Biotechnol. and Biotechnol. Eq., 8 (4): 3 –4.
- Bistray, G., and R. G6borj6nyi, 1989.** Isolation and ccharacterization of wheat dwarf virus for the first time in Hungary. Zeitschrift f6r Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 96 (5): 449 – 454.
- Clark, M. F., and N. A. Adams, 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475 – 483.
- D’Arcy, C. J., F. J. Murphy, and D. S. Miklasz, 1990.** Murine monoclonal antibodies produced against two Illinois strains of barley yellow dwarf virus. Phytopathology, 80: 377 – 381.
- Domier, L. L., 1995.** Genome structure and function of barley yellow dwarf viruses. In: Barley yellow dwarf virus. 40 yerasof progress. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 181 – 202.
- French, R., 1995.** Barley Yellow Dwarf: Diagnostic procedures and reagents. In: In: Barley yellow dwarf virus. 40 yerasof progress. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 293 – 305.
- Gill, C. C., and J. Chong, 1979.** Cytopathological evidence for the division of barley yellow dwarf virus isolates into two subgrups. Virology 95: 59 – 69.
- Habekuss, A., and Ch. O. Lehmann, 1991.** Investigation of the Gatersleben winter barley collection for resistance to barley yellow dwarf virus. Barley genetics 6: 619 – 621.
- Habekuss, A., 1994.** Evaluation of winter barley for resistance to barley yellow dwarf virus. Genet. Pol. 35: 199 – 202.
- Hewings, D. A., 1995.** Purification and virion characterization of barley yellow dwarf viruses. In: Barley yellow dwarf virus. 40 yerasof progress. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 165 – 180.
- Lindsten, K., 1991.** Wheat dwarf monogeminivirus. Viruses of plants. Description and lists from VIDE Database. Brunt A., M. Dallwitz, A. Gibbs, L. Watson (1996), 1382 - 1384.
- Lister, R. M., and J. R. Sward, 1988.** Aanomales in serological and vector relationships of MAV-like isolates of barley yellow dwarf virus from Australia. Phytopathology 78: 766 – 770.
- Martin, R. R., and C. J. D’Arcy, 1990.** Relationships among luteoviruses based on nucleic

acid hybridization and serological studies. Intervirology 31: 23 – 30.

- Martin, R. R., and C. J. D'Arcy, 1995.** Taxonomy of barley yellow dwarf viruses. In: Barley yellow dwarf virus. 40 years of progress. APS PRESS, St. Paul, Minnesota 203 – 214.
- Pead, M. T., and L. Torrance, 1988.** Some characteristics of monoclonal antibodies to a British MAV-like isolate of barley yellow dwarf virus. Ann. Appl. Biol. (113): 639 - 644.
- Plumb, R. T., and G. R. Johnstone, 1995.** Cultural, chemical and biological methods for the control of barley yellow dwarf. In: Barley yellow dwarf virus. 40 years of progress. APS PRESS, St. Paul, Minnesota, 307 – 319.
- Rochow, W. F., and E. J. Duffus, 1978.** Relationships between barley yellow dwarf virus and beet western yellows viruses. Phytopathology 68: 51 – 58.
- Rochow W. F., and E. L. Carmichael 1979.** Specificity among barley yellow dwarf viruses in enzyme immunosorbent assays. Virology 95: 415 – 420.
- Shceurer, K., W. Huth, A. Habekuss, R. Waugh, W. Friedt, and F. Ordon 2000.** Genetic analysis of tolerance against a German isolate of BYDV-PAV in barley (*Hordeum vulgare* L.). Barley Genetics 8: 169 – 171.
- Stoev, A., and N. Bakardjieva 2005.** A procedure for evaluation of the dwarf syndrome induced by viral infections in barley and wheat crops. Biotechnol. Biotechnol. Eq. 19 (2): 18 – 21.
- Vincent, J. R., M. R. Lister, and A. B. Larkins 1991.** Nucleotide sequence analysis and genomic organization of the NY-RPV isolate of barley yellow dwarf virus. J. Gen. Virol., 67: 1273 – 1281.