

ГУЛЯЄВА Г. Б.<sup>✉</sup>, БОГДАН М. М., ТОКОВЕНКО І. П., ПАТИКА В. П.

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,

Україна, 03143, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: ab\_k@ukr.net

<sup>✉</sup> ab\_k@ukr.net

## РОЛЬ ХЕЛАТОВАНОГО ДОБРИВА І НАНОЧАСТОК У ФОРМУВАННІ ЕЛЕМЕНТІВ ПРОДУКТИВНОСТІ ЗА ШТУЧНОГО ВІРУСНОГО І ФІТОПЛАЗМОВОГО УРАЖЕННЯ

**Мета.** Дослідження ролі хелатованого добрива і наночастинок у формуванні елементів продуктивності за штучного зараження фітоплазмою і вірусом смугастої мозаїки пшениці (ВСМП). **Методи.** Мікробіологічні, серологічні, біофізичні, біометричні, статистичні. **Результати.** У польових умовах досліджено вплив позакореневої обробки рослин пшениці хелатованим добривом і наночастиками міді та срібла за штучного зараження фітоплазмою і ВСМП на величину квантової ефективності фотосистеми II за контролю реплікації вірусу методом імуноферментного аналізу та досліджено вплив наночастинок на розвиток фітоплазмової інфекції, а також масу 1000 зерен пшениці. **Висновки.** Обробка хелатованим добривом дозволяє активувати фітоімунітет рослин пшениці, перешкоджаючи, таким чином, активній реплікації вірусу у рослинному організмі, певним чином знижуючи втрати продуктивності за ураження ВСМП. Застосування позакореневої обробки рослин пшениці 1%-м розчином цитратів наночастинок срібла і міді дозволяє припинити розвиток фітоплазмової інфекції, що дозволяє зберегти близький до неушкоджених рослин рівень продуктивності.

**Ключові слова:** *Triticum aestivum* L., ВСМП, фітоплазма, флюоресценція, продуктивність.

Ураження хлібних злаків фітоплазмовими і вірусними інфекціями за відсутності ефективних заходів боротьби із цими патогенами є чинником негативного впливу на урожай рослин і його якість. Поєднує цих збудників значна залежність від метаболізму рослини-хазяїна і розповсюдження комахами-шкідниками. Вірус мозаїки пшениці викликає мозаїку пшениці – хворобу злаків і трав, яка загрожує отриманню високої врожайності пшениці не тільки в Україні, але і в усьому світі. Заражені рослини відстають у рості і мають жовту мозаїку з переривчастими штрихами на листках. Відомо, що ВСМП в

Україні та за її межами уражує озиму і яру пшеницю (*Triticum aestivum* L.). Залежно від умов навколишнього середовища і технології вирощування, втрати врожаю пшениці за вірусного ураження можуть сягати 60 % і більше [1, 2]. Зараження блідо-зеленою карликовістю рослини пшениці, що викликає фітоплазма, також призводить до значних втрат урожаю.

Відомо, що, на відміну від вірусного, ураження блідо-зеленою карликовістю рослини пшениці характеризується загальним хлорозом, а також ймовірністю виникнення поліморфічних деформацій вегетативних органів, тоді як вірус-інфіковані рослини мають характерну строкатість листків. Важливі відмінності існують у технології штучного зараження рослин, зокрема, інокуляція фітоплазмою можлива лише за умов субепідермальної ін'єкції, тоді як вірусна інфекція здатна передаватися також інокуляцією свіжо-виділеним соком уражених рослин. Тому за масштабного моніторингу посівів пшениці важливо враховувати ці відмінності в особливостях розвитку названих хвороб, а також те, що на ранніх етапах патогенезу підтвердження їх ідентифікації можливе лише із застосуванням молекулярно-генетичних досліджень.

Загалом дослідження впливу уражень рослин патогенами були зосереджені за дії доступності поживних елементів на сприйнятливості рослин до інфекцій і швидкості передачі хвороб [3]. Цей вплив залежав від взаємодії між фітопатогеном і хазяїном, а також від типу підживлення рослин добривами. Дослідження впливу додавання макродобрив на реплікацію вірусу показали, що ефекти варіюються залежно від поживних елементів і патологічної системи, при цьому додавання азоту і фосфору зазвичай збільшує титр вірусу [4, 5].

Окрім цього, доволі перспективним і сучасним напрямком є застосування нанотехнологій [6], зокрема, для запобігання зараження фітопатогенними мікроорганізмами і їх розповсюдження, у тому числі фітоплазмової і вірусної

природи у ресурсозберігаючих технологіях. Тому метою нашої роботи було дослідження ролі хелатованого добрива і цитратів наночасток у формуванні елементів продуктивності за штучного зараження фітоплазмою і ВСМП.

### Матеріали і методи

Рослини пшениці *Triticum aestivum* L. сорту Зимолярка та Печерянка вирощували на дослідних ділянках Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного. Площа дослідної ділянки 50 м<sup>2</sup>, ґрунт дерново-підзолистий. Повторність у досліді чотириразова. У ґрунт перед посівом вносили N<sub>90</sub>P<sub>90</sub>K<sub>90</sub> (аміачна селітра, гранульований суперфосфат і калій хлористий). Схема дослідів на посівах пшениці сорту Зимолярка: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – ВСМП; 3 – п. о. хелатованим добривом (ХД); 4 – п. о. ХД +ВСМП. Схема дослідів на посівах пшениці сорту Печерянка: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – фітоплазма; 3 – фітоплазма + п. о. Ag-Cu; 4 – п. о. Ag-Cu.

Фітопатогенну фітоплазму *A. laidlawii* УКМ ВМ-34 культивували на рідкому живильному середовищі СМ ІМВ-72 (рН=7,8) у термостаті за температури 32°C упродовж 72 год. Штучну інокуляцію фітоплазмою *A. laidlawii* УКМ ВМ-34 у фазу кушіння проводили методом субепідермальної ін'єкції. Через тиждень після зараження проводили одноразову позакореневу обробку рослин 1 %-м розчином наночасток Ag-Cu у цитратній формі (вихідний розчин «Шумерське срібло», ТОВ «Наноматеріали і нанотехнології», Україна). У досліді на посівах пшениці сорту Зимолярка застосовували позакореневу обробку хелатованим добривом Фізіо-живлін-Р (Україна) (N – 21,1%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – 16,0%, K<sub>2</sub>O – 16,0%, CaO – 8%, MgO – 4,0%, SO<sub>3</sub> – 9,0%, B – 0,02%, Mn – 0,1%, Zn – 0,01%, Cu – 0,05%, Fe – 0,3%, Mo – 0,01%, Li – 0,005% (ЕД-ТА –1,9–2,2 %, цитрат –2,0–2,5%) [7]. Дворазове позакореневе підживлення ХД інфікованих ВСМП рослин пшениці проводили у фазі кушіння і виходу в трубку. Обприскування посівів виконували за допомогою ручного обприскувача.

Інфікували ювенільні рослини у фазі двох справжніх листків. Зараження проводили методом механічної інокуляції листків свіжоприготовленим вірусомісним матеріалом із попереднім опудрюванням карборундом [8]. Виявлення антигена здійснювали за методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням діагности-

чних сироваток до ВСМП [9, 10]. Твердофазний ІФА (сендвіч-варіант) проводили із використанням комерційних тест-систем до ВСМП «Loewe» (Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Termo LabSystems Opsi MR (США) із програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink за довжин хвиль 405/630 нм. За достовірні приймали значення, що перевищували негативний контроль у три рази [11].

Вимірювання ІФХ робили портативним приладом «Флоратест» (Україна), розраховуючи параметр квантової ефективності ФСП – F<sub>v</sub>/F<sub>p</sub> за аналітичного перерахунку критичних параметрів отриманого масиву даних [12, 13]. Повторність визначень параметрів ІФХ п'ятикратна. Статистичну обробку одержаних результатів виконували з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel.

### Результати та обговорення

Результати ІФА показали, що за ураження ВСМП вміст антигенів на 14 добу після інфікування суттєво зростав у 5,93 раза, тоді як у випадку зараження за обробки ХД їх вміст зростав менш суттєво – у 4,98 раза, а за обробки ХК+Ag-Cu – у 5,42 раза щодо контролю, а отже, знижувався порівняно із ураженими рослинами за обробки ХК+Ag та ХК – у 1,1 – 1,2 раза відповідно (рис. 1). Отже, обробка обраними біологічно активними речовинами не припиняє вірусного зараження, але сприяє його пригніченню, швидше за все, за мобілізації неспецифічної стійкості.

Водночас, попередньою перевіркою інгібуючої дії розчину цитратів наночасток Ag-Cu на ріст фітоплазм, які попередньо культивували у рідкому поживному середовищі СМ ІМВ-72, встановлено мінімальну інгібуючу концентрацію цього розчину, яка дорівнювала 0,5 з%.

Проведена діагностика квантової ефективності ФСП – F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, що, як відомо, є показником стресової дії і свідчить про стан ФСП, її насиченість фотохімічно активними реакційними центрами, показала пригнічення величини F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> за впливу як вірусної, так і фітоплазмової інфекції (рис. 2, а, б).

Водночас обробка ХД як інтактних, так і ВСМП-інфікованих рослин виявила лише тенденцію до збільшення цього показника. Хоча за обробки 1 %-м розчином цитратів наночасток Ag-Cu інтактних рослин спостерігалось пригнічення величини F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>, обробка інфікованих фітоплазмою рослин сприяла зростанню цього

показника до рівня контрольних рослин (рис. 2 б). Таким чином, обробка ХД підтримувала активний стан фотосинтетичного апарату, зокрема реакційних центрів ФС II, за мобілізації фітоімунітету рослин, перешкоджаючи активній реплікації вірусу в рослинному організмі.

У той же час цитратний комплекс Ag-Cu дозволяв інгібувати ріст клітин фітоплазми у судинах рослини – флоємі і ситовидних трубках, хоча зниження величини  $F_v/F_m$  для інтактних рослин свідчило про надмірність обраної

концентрації, яку за отриманими вище даними можна знизити принаймні вдвічі.

Визначення впливу на формування зернової продуктивності оцінювали за таким важливим показником, як маса 1000 зерен. Отримані дані показали, що суттєве підвищення цього показника спостерігалось на варіантах за обробки ХД і ХД+Ag-Cu (рис. 3). Відповідне зниження маси 1000 зерен відбувалося за умов вірусного і фітоплазмозового інфікування (рис. 3 а і б).

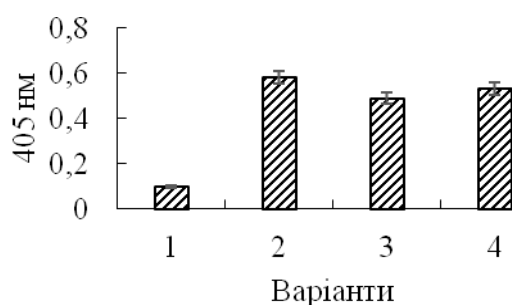


Рис. 1. Дані ІФА за впливу штучного зараження ВСМП: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – ВСМП; 3 – ХД+ВСМП; 4 – ХД+Ag-Cu +ВСМП (мікропольовий дослід, 2017 р.).

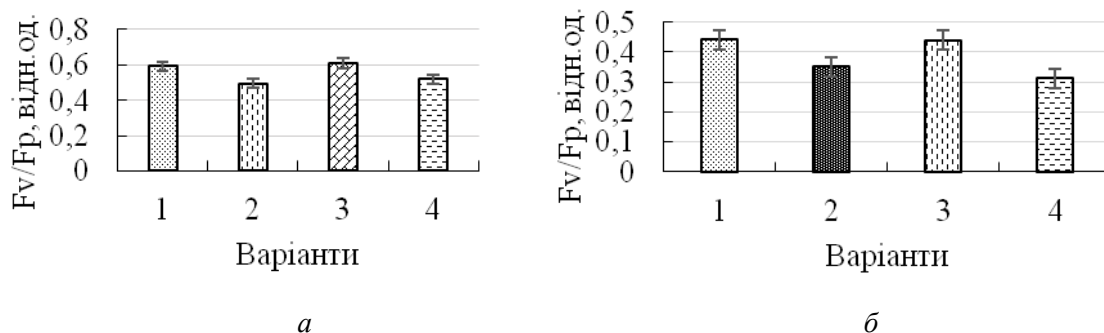


Рис. 2. Квантова ефективність ФС II фотосинтетичного апарату рослин пшениці за штучного зараження ВСМП (а) і фітоплазмою (б) та обробки біологічно активними речовинами; а: 1– контроль (інтактні рослини); 2 – ВСМП; 3 – п. о. ХД; 4 – п.о. ХД+ВСМП; б: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – фітоплазма; 3 – фітоплазма + п. о. Ag-Cu; 4 – п. о. Ag-Cu.

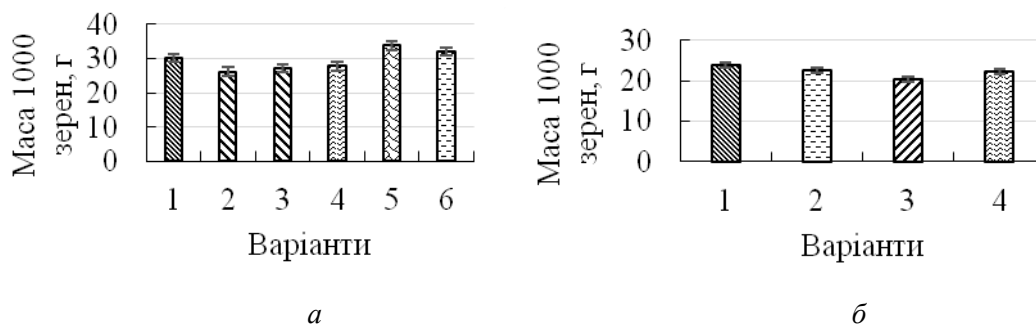


Рис. 3. Маса 1000 зерен за передпосівної обробки біологічно активними речовинами та штучного зараження ВСМП (а) і фітоплазмою (б). а: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – ВСМП; 3 – ХД+ВСМП; 4 – п. о. ХД+Ag-Cu+ВСМП; 5 – інтактні рослини п. о. ХД; 6 – інтактні рослини + п. о. ХД+Ag-Cu; б: 1 – контроль (інтактні рослини); 2 – п. о. 1 %-м р-ном Ag-Cu; 3 – фітоплазма; 4 – п. о. 1 %-м р-ном Ag-Cu + фітоплазма.

## Висновки

1. Обробка хелатованим добривом дозволяє активувати фітоімунітет рослин пшениці, перешкоджаючи, таким чином, активній реплікації вірусу у рослинному організмі, певним чином знижуючи втрати продуктивності за ураження ВСМП.

2. Застосування позакореневої обробки рослин пшениці 1 %-м розчином цитратів наночасток срібла і міді дозволяє припинити розвиток фітоплазмової інфекції, що сприяє збереженню близького до неушкоджених рослин рівня продуктивності.

## References

- Hadi B.A.R., Langham M.A.C., Osborne L., Tilmon K.J. *Wheat Streak Mosaic Virus* on Wheat: Biology and Management. *Journal of Integrated Pest Management*. 2011. Vol. 2, Iss. 1. P. J1–J5. doi: 10.1603/IPM10017.
- Singh K., Wegulo S.N., Skoracka A., Kundu J.K. *Wheat streak mosaic virus*: a century old virus with rising importance worldwide. *Molecular Plant Pathology*. 2018. Vol. 19, Iss. 9. P. 2193–2206. doi: 10.1111/mpp.12683.
- Dordas C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2008. Vol. 28, Iss. 1. P. 33–46. doi: 10.1051/agro:2007051.
- Pennazio S., Roggero P. Mineral nutrition and systemic virus infections in plants. *Phytopathol. Mediterr.* 1997. Vol. 36, No. 1. P. 54–66.
- Miller Z.J., Lehnhoff E.A., Menalled F.D., Burrows M. Effects of Soil Nitrogen and Atmospheric Carbon Dioxide on *Wheat streak mosaic virus* and Its Vector (*Aceria tosichella* Kiefer). *Plant Dis.* 2015. Vol. 99, No. 12. P. 1803–1807. doi: 10.1094/PDIS-01-15-0033-RE.
- Prasad R., Bhattacharyya A., Nguyen Q.D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. *Front Microbiol.* URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01014/full>. doi: 10.3389/fmicb.2017.01014 (Last accessed: 06.02.2019).
- Sposib pidvyshchennia produktyvnosti pshenytsi ozymoї iz zastosuvanniam rıdkoho kompleksnoho dobrovya, shcho mistyt khelaty mikroelementiv: pat. 113638 Ukraina MPK (2016.01) A01C 21/00 C05G 1/00 C05D 9/02 (2006.01) C05D 11/00 C05D 11/00. No u 2016 07482; appl. 08.07.2016; publ. 10.02.2017, Bul. No 3. 6 p. [in Ukrainian] / Спосіб підвищення продуктивності пшениці озимої із застосуванням рідкого комплексного добрива, що містить хелати мікроелементів: пат. 113638 Україна МПК (2016.01) A01C 21/00 C05G 1/00 C05D 9/02 (2006.01) C05D 11/00 C05D 11/00. № u 2016 07482; заявл. 08.07.2016; опубл. 10.02.2017, Бюл. № 3. 6 с.
- Metody opredeleniya bolezney i vreditel'ey selskokhozyaystvennykh rasteniy / Per. s nem. K.V. Popkovoy, V.A. Shmygli. Moscow: Agroprom-izdat., 1987. 224 s. [in Russian] / Методы определения болезней и вредителей сельскохозяйственных растений / Пер. с нем. К.В. Попковой, В.А. Шмыгли. М.: Агропром-издат, 1987. 224 с.
- Antitela 1. Metody / pod red. D. Ketti. Moscow: Mir. 1991. 196 s. [in Russian] / Антитела 1. Методы / под ред. Д. Кэтти. М.: Мир, 1991. 196 с.
- Gnutova R.V. Serologiya i immunokhimiya virusov rasteniy. Moscow: Nauka. 1993. 300 s. [in Russian] / Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений. М.: Наука, 1993. 300 с.
- Crowther J.R. ELISA. Theory and practice. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995, 223 p.
- Lichtenthaler H.K., Babani F., Langsdorf G. Chlorophyll fluorescence imaging of photosynthetic activity in sun and shade leaves of trees. *Photosynth Res.* 2007. Vol. 93. P. 235–244. doi: 10.1007/s11120-007-9174-0.
- Sharma D.K., Andersen S.B., Ottosen C., Rosenqvist, E. Wheat cultivars selected for high  $F_v/F_m$  under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiologia plantarum*. 2015. Vol 153. P. 284–298. doi: 10.1111/ppl.12245.

## HULIAIEVA H. B., BOHDAN M. M., TOKOVENKO I. P., PATYKA V. P.

*Institute of Microbiology and Virology NASU,  
Ukraine, 03143, Kyiv, Acad. Zabolotny str., 154, e-mail: ab\_k@ukr.net*

## ROLE OF CHELATED FERTILIZERS` AND NANO-PARTICLES APPLICATION FOR FORMATION OF ELEMENTS OF PRODUCTIVITY AT ARTIFICIAL INFECTED WITH PHYTOPLASMAS AND VIRUS

**Aim.** Investigation of the role of chelated fertilizer and nanoparticles in the formation of elements of productivity for artificial infection of phytoplasmas and wheat streak mosaic virus. **Methods.** Microbiological, serological, biophysical, biometric, statistical. **Results.** In the field conditions, the effect of leaf treatment of wheat plants with chelated fertilizers and nanoparticles of copper and silver for artificial infection of phytoplasmas and WSMV on the magnitude of the quantum efficiency of photosystem II for controlling replication of the virus by the method of immunoassay analysis and the study of the influence of nanoparticles on the development of phytoplasmas, as well as the weight of 1000 grains of wheat was investigated. **Conclusions.** Foliar treatment with chelated fertilizer can activate the plant's phytoimmunity of wheat plants, thus preventing the active replication of the virus in the plant organism, thereby reducing somewhat the loss of productivity for the damage to the WSMV. The use of foliar treatment of wheat plants with 1% solution nanoparticles of silver and copper citrates can stop the development of phytoplasma infection, which allows maintaining a level of productivity close to the intact plants.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., WSMV, phytoplasma, chlorophyll a fluorescence induction, productivity.