

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Известия ТСХА, выпуск 2, 2002 год

УДК 632.38А/З:634.75

ОБЗОР МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЗЕМЛЯНИКИ

О. О. БЕЛОШАПКИНА

(Кафедра фитопатологии)

На основе материалов собственных исследований и анализа научной литературы описываются методы диагностики вирусных и фитоплазменных заболеваний земляники: визуальный, индикаторный, иммуноферментный, молекулярные (с использованием полимеразной цепной реакции и ДНК-зондов), электрофоретический, электронно-микроскопический. Отмечаются их недостатки и преимущества.

Инициатором изучения вирусных болезней сельскохозяйственных растений, в частности картофеля, зернобобовых, овощных и ягодных культур, в России был Михаил Семенович Дунин. Большое значение для общей и частной вирусологии имели его труды по разработке методов диагностики вирусов. Так, капельный метод серологического анализа для диагностики вирусных заболеваний быстро получил признание в нашей стране и за рубежом, во многих вирусологических исследованиях использовалась разработанная под руководством этого талантливого ученого специальная микрокамера. На кафедре фитопатологии МСХА в течение всего периода ее существования поддерживается традиция, начатая ее основателем М. С. Ду-

ниним, и проводятся вирусологические исследования. В настоящий период времени работы в основном ведутся с вирусными болезнями картофеля и земляники.

Земляника — многолетняя, вегетативно размножаемая культура, является благоприятным растением-хозяином для вирусных и фитоплазменных патогенов, количество которых по различным данным колеблется от 27-29 до 54 [8]. Экономическое значение из них имеют 4 сокопереносимых вируса: морщинистости, крапчатости, окаймления жилок и латентный вирус С земляники. Менее патогенными являются поражающие эту культуру сокопереносимые неповирусы, переносчиками которых являются нематоды родов *Xiphinema* и *Longidorus*. На территории

России из неовирусов выявлен вирус мозаики резухи (ВМР), вирус латентной кольцевой пятнистости земляники (ВЛКПЗ), черной кольцевой пятнистости (кольчатости) томата (ВЧКПТ), редко встречаются вирус кольцевой пятнистости томата (ВКПТ) и вирус кольцевой пятнистости малины (ВКПМ). Из фитоплазмозов регистрировали пожелтение лепестков земляники и ведьмины метлы. Распространенность и вредоносность этих вириозов и фитоплазмозов крайне неодинаковы. В основном они снижают урожай и биологическую продуктивность, даже будучи в латентной форме; некоторые из них могут приводить к гибели растения земляники к гибели. Изучение видового и штаммового состава, распространенности, биологических особенностей и механизмов взаимодействия вирусов и растений необходимо для последующей разработки мер профилактики и защиты культуры земляники от вирусных заболеваний. Важнейшим этапом изучения вирусов является их выявление и идентификация.

Диагностика вириозов и фитоплазмозов земляники отличается большой сложностью по сравнению, например, с таковыми заболеваниями картофеля или овощных культур, во-первых, потому что практически все сорта в умеренном климате являются бессимптомными носителями,

а во-вторых, потому что основные специфические вирусы, поражающие эту культуру, например, крапчатости земляники (*strawberry mottle virus*), морщинистости земляники (*strawberry crinkle virus*) нестойки вне клетки растения.

Визуальная оценка вириозов земляники является очень приблизительной. Обследование посадок по внешним признакам заболеваний проводится в наиболее оптимальные сроки их проявления — обычно в конце мая — начале июня. На маточных и коллекционных посадках отмечены различные нарушения в развитии растений, указывающие на возможное наличие вирусной инфекции, к ним относятся прежде всего симптомы морщинистости листьев. При осенних обследованиях обнаруживали симптомы крапчатости, при этом листья были мельче, имели морщинистый вид, на верхней стороне листьев были хорошо заметны точечные хлоротические участки. На отдельных сортах отмечали симптомы пожелтения краев листьев, окаймление жилок, скручивание листьев.

На землянике подавляющее большинство вирусов находится в латентной форме; появляющиеся на некоторых сортах симптомы нечеткие и быстро исчезают, поэтому их детальное описание на промышленных сортах земляники невозможно. Большинство таких сортов является толерантными к основным вириозам

зам, например, к крапчатости и морщинистости, и заражение ими визуально не обнаруживается даже после искусственного заражения [1, 10]. Симптомы поражения не-повирусами часто проявляются в виде карликовости, мозаичных колец, линий и пятен на листьях, но аналогичные симптомы вызываются также стеблевыми нематодами, клещами, тлями, некоторыми грибными патогенами, ятрогенными болезнями. Отмечается сильная изменчивость как реакции самих сортов, так и симптомов разных штаммов вирусов или их латентный характер взаимодействия с растениями.

Из-за бессимптомного протекания заболеваний основным методом диагностики, широко используемым на практике, является индикаторный анализ, т. е. тестирование при помощи растений-индикаторов. Индексация осуществляется прививкой тестируемого образца на растения-индикаторы, в качестве которых используют специально отобранные высокочувствительные клоны лесной (*Fragaria vesca*) и виргинской земляники (*F. Virginian a*), при этом ни один из известных индикаторных клонов не является достаточным для диагностики основных вирусов земляники, требуется, по крайней мере, 2 клона. Большинство вирусов диагностируется на *F. vesca*. Нами используются наиболее часто

клоны EM K, EMC, UC-2, UC-4, UC-5, FV-72, Am. seed, а также выделенные в качестве индикаторов сорта *F. vesca*: Рюген и Роте Золимахер, дополнительно материал проверяем на клоне *F. virginiana* [3].

В настоящее время наиболее часто проводится тестирование методом прививки черешком листа. С целью сокращения расхода листьев, отбираемых для тестов, что особенно актуально для единичных экземпляров сортообразцов, полученных *in vitro*, нами был предложен метод прививки отдельными фрагментами черешка листа, который также дает достоверные результаты, проводится быстро и требует минимальной площади [2]. Продолжительность теста, по нашему опыту, достаточна в течение 6 мес при условии проведения минимум 4 ежемесячных учетов симптомов на индикаторах и исключения из времени теста жаркого летнего периода, когда в теплицах создаются условия температурного режима, соизмеримые с режимом суховоздушной термотерапии вирусов, которые могут исказить результаты вирусологической проверки.

Тест на травянистых растениях-индикаторах (виды мари, табака, фасоли) методом механической инокуляции листьев применяется редко из-за низкой чувствительности и нестабильности результатов и возможен для выяв-

ления только сокопереносимых вирусов: мозаики резухи, кольцевой пятнистости малины, кольцевой пятнистости томата, черной кольчатости томата.

Производство оздоровленного посадочного материала и фитовирусологические исследования невозможны без современных методов диагностики вирусов. Одним из таких методов является иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на получении антисывороток к вирусам. Методика ИФА для выявления сокопереносимых вирусов ягодных культур применительно к средней полосе России достаточно хорошо отработана [6, 7] и при условии наличия антисывороток и необходимого оборудования не представляет трудностей. Этим методом успешно диагностируются вирусы, поражающие землянику из группы неповирусов (мозаики резухи, кольцевой пятнистости малины, кольцевой пятнистости томата, черной кольчатости томата, латентный вирус кольцевой пятнистости земляники).

Однако область применения этого метода весьма ограничена на землянике из-за наличия ряда сокопереносимых вирусов, частицы которых необратимо разрушаются либо в экстрактах сока, либо в процессе очистки. Получение антисывороток к таким вирусам, как, например, вирусы морщинистости, крапчатости, окаймления жилок,

слабого пожелтения краев листьев земляники, в настоящее время не представляется возможным. Кроме того ИФА не охватывает всего круга вирусов и их возможных штаммов, поскольку часто в пределах одного и того же вируса антигенные свойства различных его штаммов не перекрываются. Такие вирусы диагностируют методом прививки на растения-индикаторы, достаточно трудоемким, продолжительным во времени, требующим наличия зимних теплиц и большого количества растений-индикаторов.

Достоверность результатов и чувствительность диагностики вирусных болезней земляники методом прививки на индикаторные клоны земляники лесной соизмеримы с модификацией серологического метода — иммуноферментным анализом, что было подтверждено в совместной работе с лабораторией вирусологии ВСТИСП с имеющимся там набором диагностических сывороток к широкоспециализированным вирусным патогенам [4].

Исследования последнего десятилетия показали возможность использования при диагностике вирусных заболеваний метода электрофореза белков или нуклеиновых кислот. Данный метод позволяет установить природу болезнетворного агента (вирион, вирус или фитоплазменный организм), определить моле-

кулярную массу, макроструктуру и концентрацию белков и нуклеиновых кислот, контролировать качество очистки вирусных препаратов и иммуноглобулинов, анализировать конечный продукт полимеразной цепной реакции. Он выделяется в самостоятельный метод диагностики некоторых флэомограниченных вирусов, вириодов, так называемых криптических вирусов. На ягодных культурах этот метод разрабатывался и апробировался для диагностики вирусов хлороза жилок малины, морщинистости земляники и крапчатости земляники [5]. Однако пока еще выявление вирусов на растениях садовой земляники с помощью электрофореза не обеспечивает стабильных, четких результатов, хотя в зараженных крапчатостью индикаторных клонах земляники лесной этот вирус определялся.

В последние годы за рубежом и в России, в частности в ВНИИ с.-х. биотехнологии (ВНИИСБ) разрабатывается универсальный метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики вирусов растений, в котором наличие вируса определяется в пределах группы, независимо от вида и штамма. Метод основан на выявлении сходных участков генома фитовирусов, принадлежащих к одной группе, химическом синтезе соответствующих коротких фрагментов (праймеров) генома и ферментативном воспроизведе-

нии (амплификации) определенных участков. Наличие продуктов ПЦР, определяемое электрофорезом, свидетельствует о наличии определенных групп вирусов и/или их конкретных представителей в исследуемом растении. Метод дорогой, трудоемкий, требует довольно сложного оборудования и реактивов, но является перспективным. К достоинствам метода относится его высокая чувствительность (в 10-1000 раз чувствительнее иммунохимических методов диагностики), возможность выявления новых вирусов и штаммов, нет зависимости от присутствия вируса и/или его штамма в пределах группы, возможно использование метода для таксономии фитовирусов. Методы гибридизации нуклеиновых кислот и полимеразной цепной реакции были успешно испытаны за рубежом для диагностики вирусов слабого пожелтения краев листьев и окаймления жилок земляники [9, 11], но они не получили широкого распространения и пока не предусмотрены для использования в европейских сертифицированных программах из-за их высокой стоимости.

Нами совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной вирусологии ВНИИСБ была испытана возможность диагностики вирусов земляники, относящихся к группам потеке- и карлавирусов. Определенные трудно-

сти возникли на этапе пробоподготовки образцов при выделении общей РНК. Несмотря на это в образцах земляники сортов Брайтон и Дукат, вегетировавших в открытом грунте, был выявлен вирус слабого пожелтения краев листьев (strawberry pseudo mild yellow edge virus-SPMYEV), относящийся к группе карлавирусов. Мы считаем, что ПЦР-метод является очень перспективным, позволяющим выявлять вирусы всех групп, и после доработки технологии его применения станет основным методом тестирования в системе производства оздоровленного посадочного материала земляники.

Кроме вирусов на садовой землянике достоверно выявлено поражение фитоплазменными патогенами, в основном вызывающими пожелтение лепестков земляники. Идентификацию фитоплазмозов проводят на практике визуально по характерным симптомам, с помощью прививки на определенные растения-индикаторы (барвинок розовый) и по реакции на антибиотики тетрациклинового ряда. Для обнаружения инфекционного процесса, вызванного фитоплазмами, и контроля за его развитием на растениях земляники возможно также использование метода ДНК-зондов. Метод определения микоплазм в растительном материале основан на ДНК-

ДНК-гибридизации и использовании универсального ДНК-зонда, специфичного только для представителей класса *Mollicutes* (к которому и относятся фитоплазмы).

Результаты анализов, проведенных методом ДНК-зондов в Казанском институте биохимии и биофизики, показали присутствие фитоплазм в отобранных нами на Плодовой станции МСХА в 1999 г. образцах земляники с симптомами, типичными для пожелтения лепестков земляники.

Диагностика вирусов и фитоплазм земляники методом электронной микроскопии затруднена (дорогие оборудование и реактивы, сложное выделение, срезы окисляются и др.) и возможна для проверки единичных образцов, используется крайне редко, в основном для таксономии.

Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, цикл развития которых теснейшим образом связан с обменом веществ клеток растений-хозяев, поэтому борьба с этими патогенами в посадках растений невозможна. Единственным эффективным способом снижения их вредоносности является использование оздоровленного посадочного материала высокого качества. Среди методов, применяемых для оздоровления этой культуры, наиболее широко на практике используются методы термотерапии и культуры изолированных

апексов. Производство безвирусных растений земляники осуществляется в научно-исследовательских учреждениях. (МСХА, ВСТИСП), где организовано полное поэтапное оздоровление и ускоренное размножение в специальных питомниках.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белошапкина О. О. Биологическая продуктивность и урожайность земляники при вирусной инфекции. — Изв. ТСХА, вып. 5, 1985, с. 139—145. — 2. Белошапкина О. О. Тестирование земляники методом прививки отрезками черешка. — Сб. докл. ЛСХА. Проблемы интенсификации садоводства в Нечерноземной зоне РСФСР. Л., 1988, с. 77-80. — 3. Белошапкина О. О., Волкова Т. И. Возможные растения-индикаторы на вирусы земляники. — Пробл. интенсификации садоводства в Нечернозем. зоне РСФСР. М., 1989, с. 77-80. — 4. Белошапкина О. О. Распространенность вирусных болезней земляники в Московской области. — Докл. ТСХА, 1999, вып. 271,

с. 41-49. — 5. Кандыба Д. Н. Изучение возможности использования электрофореза белков и нуклеиновых кислот для диагностики вирусных и вирусоподобных болезней ягодных культур. — Автореф. канд. дис. М., 1999. — 6. Лукьянова Е. А. Особенности производства безвирусного посадочного материала земляники и малины в ЦЧР. — Автореф. канд. дис. Мичуринск, 1998. — 7. Суркова О. Ю. Анализ распространения, вредности, этиологии вирусных и вирусоподобных болезней красной и черной смородины и разработка мер борьбы с ними в Средней полосе России. — Автореф. канд. дис. М., 1994. — 8. Converse R. H. (ed.) Virus diseases of small fruits. U.S. Dept. of Agriculture, Agr. Hdbk, 1987. — 9. Converse R. H., Adams A. N., Barbara D. J., Clark M. F. et al. — Plant Dis., 1988, vol. 72, N 9, p. 744-749. — 10. Graichen K. — Arch. Gartenbau, 1982, H. 30, No 3, S. 133-138. — 11. Yoshikawa N., Poolpol P., Inouye T. — Ann. Phytopatol. Soc. Jpn, 1986, vol. 52, p. 728-731.

*Статья поступила
24 октября 2001 г.*

SUMMARY

Based at the own investigations and sources of literature information different methods of strawberry virus and phytoplasm diseases detection are described in the article. Imperfection and advantages of different methods such as: visual, methods of plant indicators, serological test (ELISA) molecular (DNA-dotter, polymerase chain reaction), electrophoretic and electronical microscopy are described.