

УДК 632.38.07

УЛУЧШЕНИЕ ВИЗУАЛЬНОЙ И СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ

В. А. ШМЫГЛЯ

(Кафедра фитопатологии)

Защита растений от вирусных болезней на всех ее этапах связана с диагностикой и зависит от нее. В последние годы все чаще возникает необходимость обнаружения и определения вирусов не только в растениях, вегетирующих в обычных условиях, но и в семенах, проростках, почве, насекомых-переносчиках, растениях, развившихся из культур тканей на питательной среде. Решение этих задач требует высокой чувствительности, достоверности и специфичности методов диагностики. Практическая диагностика должна представлять собой систему методов в оптимальном их сочетании для каждой конкретной задачи.

В развитии методов диагностики вирусов растений с самого начала наметились две тенденции: разработка все более чувствительных, но и более сложных методов, применимых в хорошо оборудованных лабораториях (спектрофотометрия, электрофорез, иммуноэлектрофорез и др.), и разработка сравнительно простых методов для широкого применения, в частности, в производственных лабораториях и в полевых условиях. Второе направление тесно связано с созданием и внедрением в практику защитных мероприятий против вирусных болезней культурных растений.

Литературные данные последних лет свидетельствует о том, что возможности улучшения визуальной и серологической диагностики вирусных болезней растений еще далеко не исчерпаны.

Визуальная диагностика

При визуальной диагностике исследователи сталкиваются с двумя главными трудностями: латентной (бессимптомной) инфекцией, сходством симптомов некоторых вирусных болезней с признаками грибных, бактериальных болезней и нарушений минерального питания растений.

Широко распространена латентная зараженность картофеля, диких и сорных растений вирусами X и S, встречается латентность вируса табачной мозаики на помидоре, вирусов Y, M, F на картофеле, вируса обыкновенной мозаики фасоли и других. Сравнительно недавно была обнаружена латентность вируса скручивания листьев на картофеле [11].

Известно, что проявление симптомов вирусных болезней зависит в первую очередь от условий вегетации растений, а также от сорта, штамма вируса и сочетания возбудителей при сложных инфекциях, однако общее состояние изученности этого вопроса таково, что в большинстве случаев использовать имеющиеся сведения в практических целях очень трудно. Особенно мало данных о влиянии на проявление вирусных заболеваний режимов хранения семенного и посадочного материала, химических и механических воздействий на растения.

На кафедре фитопатологии (Н. П. Морозова, 1975—1977 гг.) было испытано воздействие некоторых приемов на проявление симптомов вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК). Клубни от растений, за-

раженных ВСЛК, распределили в каждом клоне по следующим вариантам: 1 — весенняя посадка (контроль); 2 — весенняя посадка, декапитация растений (удаление верхушек стеблей); 3 — проращивание клубней на свету, весенняя посадка; 4 — проращивание на свету, летняя посадка; 5 — хранение клубней в холодильнике (1—4°), летняя посадка. Проявление и характер симптомов ВСЛК сравнивали по вариантам опыта внутри каждого клона во все фазы развития растений. Как показал визуальный учет поражения растений, в конце цветения (срок последней браковки картофеля в питомниках первичного семеноводства) в среднем за 3 года при обычной весенней посадке (контроль) было 2,8% кустов со скрытой инфекцией ВСЛК, при весенней посадке (декапитация) — 0; при проращивании клубней на свету перед весенней и летней посадкой — соответственно 1,1 и 1,8; при хранении клубней в холодильнике (летняя посадка) — 0,9%.

Наилучшие результаты дали декапитация растений и летняя посадка после холодного хранения клубней. Полученные данные подтвердили широкое распространение латентной зараженности картофеля ВСЛК и показали возможность выявления этой зараженности с помощью простых приемов, применимых в любом семеноводческом хозяйстве.

Вирус Y картофеля обычно связывают с тяжелыми симптомами на растениях: мозаикой, деформацией листьев, общим некрозом. По нашим наблюдениям в полевых условиях с применением индикаторной диагностики, этот вирус, по крайней мере у некоторых сортов, может находиться в латентном состоянии иногда в течение всей вегетации. Об этом же свидетельствуют и внезапные вспышки массового поражения сортов картофеля, восприимчивых к вирусу Y, морщинистой и полосчатой мозаикой. Отсюда следует, что визуальная диагностика этого вируса далеко не всегда эффективна и необходимы специальные приемы и методы обнаружения скрытой зараженности.

Известно, что в результате воздействия повышенных температур на клубни картофеля усиливается проявление тяжелых вирусных болезней у растений [6, 12]. Влияние переменного температурного режима на клубни при их хранении мы изучали на клоновом материале картофеля сорта Гатчинский, частично зараженном мозаичными вирусами. Клубни в каждом клоне (гнезде) разделили на две части. Одну хранили в обычных условиях при 2—3°, вторую — в камере, где поддерживался переменный температурный режим: в течение 20 ч 3° и затем 4 ч 35°. Через 90 дней клубни обоих вариантов высадили в почву, отметив номера клонов. В 17 из 100 клонов опытного варианта (переменный режим) развились растения с морщинистой мозаикой, в контрольном варианте признаков вирусных болезней не было. Во всех клонах с морщинистой мозаикой серологическим методом был обнаружен вирус Y. Таким образом, длительное воздействие переменного температурного режима на клубни вызвало проявление латентной зараженности вирусом Y. Резкие колебания температуры в течение суток являются обычными при весеннем световом проращивании клубней под временными укрытиями, следовательно, этот прием не только позволяет получить более ранние всходы, но и повышает эффективность визуальной диагностики вирусов, в частности вируса Y.

Не менее важна визуальная диагностика вирусов в селекции картофеля при отборе гибридных семян, устойчивых к вирусам, так как при больших объемах селекционной работы (десятки и сотни тысяч семян) другие методы диагностики в первых селекционных питомниках практически неприменимы.

Известно, что воздействие сублетальных температур (термический шок) усиливает некротическую реакцию листьев, инокулированных вирусами [10]. Однако в отношении вируса Y на картофеле такое воздействие не изучалось. Для выяснения этого вопроса мы брали от гибри-

ных сеянцев картофеля через 9—18 дней после инокуляции вирусом Y с помощью пневматического пистолета по два листа, один из которых погружали в воду при 50° на 40 с, затем оба листа помещали в светопроницаемую влажную камеру. Через 3—5 дней на некоторых листьях появились некротические пятна — симптомы заражения. Результаты учета некрозов по каждому сеянцу показали, что из 754 растений при обработке термошоком у 168, или у 22,3%, а без такой обработки — у 84, или у 12,4%, были некрозы на отделенных листьях, т. е. обработка почвы вдвое увеличила количество растений с некротической реакцией на вирус Y.

В опытах, проведенных дипломниками кафедры фитопатологии (А. А. Андреева, Т. П. Азанова, 1977—1978 гг.) в НИИ картофельного хозяйства, изучалось влияние обработок картофельных растений растворами некоторых соединений на проявление симптомов вируса при искусственном заражении. Гибридные сеянцы через сутки после инокуляции вирусом Y с помощью пневматического пистолета обрабатывали 0,1% растворами сульфата марганца и гипосульфита натрия отдельно и в сочетании. Через 2 сут обработку повторяли, а спустя 15 и 30 сут проводили учет проявления симптомов заражения, результаты которого показали следующее (% растений с признаками некроза):

	1977 г.	1978 г.
1 — без обработки (контроль)	8,5	1,4
2 — опрыскивание 0,1% раствором сульфата марганца	10,7	7,0
3 — опрыскивание 0,1% раствором гипосульфита натрия	10,3	1,3
4 — варианты 2+3	21,8	14,1

Различия между результатами, полученными в варианте 4 и в контроле, статистически достоверны. Обработка указанными растворами незараженных растений не вызывала некрозов.

Количество растений с некротическими симптомами вируса увеличилось под влиянием обработки растворами сульфата марганца и гипосульфита натрия в 2,5—10 раз по сравнению с контролем, что значительно облегчило визуальную диагностику зараженности и отбор устойчивых сеянцев.

На основании приведенных выше данных можно сделать вывод, что достоверность визуальной диагностики ВСКЛ и вируса Y картофеля может быть значительно повышена с помощью сравнительно простых методов.

Серологическая диагностика

За 50 лет со времени открытия антигенных свойств растительных вирусов было предложено множество вариантов серодиагностики, однако до сих пор ни один из них не позволяет полностью преодолеть трудности, встречающиеся при практическом применении метода. Можно сказать, что большинство этих трудностей существует и в настоящее время. Важнейшие из них заключаются в следующем: невысокая по сравнению с другими методами чувствительность; ограниченное число вирусов, к которым имеются диагностические сыворотки; большая зависимость результатов серодиагностики от многих факторов, в том числе от условий, складывающихся в период вегетации растений, их возраста и физиологического состояния, различных внешних воздействий на растения, семена и посадочный материал, а также от штаммовых особенностей возбудителя. Исследовательская работа в области серодиагностики вирусов растений в большой мере направлена на уменьшение этих трудностей.

Первое место по практическому применению серодиагностики занимают семеноводство и селекция картофеля. Еще недавно в разработке

методик серодиагностики для широкого практического применения много внимания уделялось производительности труда, что было связано с большими объемами проверяемого материала. Однако развитие методов получения и размолаживания здорового картофеля изменило и задачи диагностики: при проверке исходного материала, оздоровленного методом культуры меристемы, анализируется сравнительно небольшое количество растений, но предъявляются высокие требования к достоверности результатов. Ошибка в определении зараженности исходного материала приводит к большим бесполезным затратам труда и времени на его размножение. Поэтому повышение чувствительности серодиагностики остается одной из важнейших задач.

Большинство вариантов серодиагностики для практического применения разработано на основе капельного метода М. С. Дунина и Н. Н. Поповой [3]. При наиболее распространенных в настоящее время методиках используют сок, выжатый из листьев и осветленный путем центрифугирования до полной прозрачности [2, 4]. Следует отметить,

Серологический титр вируса X картофеля и ВТМ при разных методиках приготовления растительного реагента

Осветление	Сок из листьев				Экстракт из измельченных листьев	
	свежих		замороженных		ХВК	ВТМ
	ХВК	ВТМ	ХВК	ВТМ		
Без осветления	32	64	16	32	32	64
Фильтрация через вату	32	64	8	16	32	64
Центрифугирование	15	32	8	16	16	32

однако, что такая подготовка реагента для анализа не является оптимальной для чувствительности диагностики. Известно, что значительная часть вируса в зараженной клетке находится в адсорбированном состоянии на клеточных структурах и при отжатии сока остается в тканях. Увеличить концентрацию вируса в жидкой фазе можно путем экстракции его буферно-солевым раствором нейтральной или слабокислой реакции.

Для сравнения различных методов подготовки реагента для серодиагностики мы провели следующий опыт. Навески по 5 г из усредненных образцов листьев картофеля, зараженного вирусом X (ХВК), и листьев помидора, зараженного вирусом табачной мозаики (ВТМ), измельчали в равном по массе количестве физиологического раствора (0,85% NaCl). Суспензию пропускали через вату с помощью пипетки, при этом получали полупрозрачный экстракт, содержащий мелкие взвешенные частицы не более 3 мкм. Из других навесок тех же листьев в свежем состоянии и после замораживания при -3° отжимали сок с помощью ручного пресса. Сок центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин. В экстракте, осветленном и неосветленном соке определяли титр вирусного антигена путем разведения физиологическим раствором. Анализ проводили капельным методом с точным дозированием реагентов.

Как видно из таблицы, центрифугирование сока или экстракта снижало титр ХВК и ВТМ на одно разведение. Различие невелико, однако оно может иметь значение при низкой концентрации диагностируемых вирусов в растениях. Наименьшим титр реакции оказался у сока листьев после их замораживания. Фильтрация через вату снижала титр вирусов только в соке из замороженных листьев.

При диагностике вирусов в растениях, развившихся из культуры меристемы, обычны и низкая концентрация вирусов в тканях, и очень

небольшой объем исследуемого образца. В этих условиях отжатие достаточного количества сока и его центрифугирование могут быть затруднительными или невозможными, поэтому наиболее целесообразным методом приготовления растительного реагента является экстракция из измельченной ткани.

Нами совместно с Г. В. Кленяевым [7] разработана методика серологической диагностики вирусов в небольших количествах исследуемой ткани. Она основана на том, что суспензия растительного образца в физиологическом растворе проходит через пористую перегородку, разделяющую суспензию и сыворотку. Реакция осуществляется в смеси фильтрата с сывороткой.

Трудности в серодиагностике вирусов вызывает также замедленное накопление вирусного антигена, наблюдаемое у разных вирусов. Довольно часто это отмечается у вируса М на картофеле и вируса табачной мозаики на помидоре [1, 8]. В зараженных растениях вирус может быть обнаружен индикаторным методом, однако серодиагностика дает отрицательный результат иногда в течение всей вегетации, при этом в других растениях в тех же условиях содержание вирусного антигена оказывается высоким. Разумеется, при таком «дефектном» состоянии вируса существенно уменьшается достоверность его серодиагностики, поэтому возникает вопрос о путях снижения вероятности подобных ошибок.

Мы провели следующий опыт с картофелем сортов Лорх и Гатчинский. Клубни, убранные покусно, разделили в каждом клоне (гнезде) на две части; одну часть оставили в хранилище при 2—3°, другую поместили в камеру с переменным температурным режимом: 20 ч — 3°, 4 ч — 35°. Через 3 мес клубни обоих вариантов высадили в почву, сохранив нумерацию клонов. В молодых растениях через 20 дней после всходов диагностировали вирус М серологическим методом. Результаты серодиагностики показали, что растения из клубней сортов Лорх и Гатчинский, хранившихся при переменном температурном режиме (3—35°), дали соответственно на 30 и 13% больше положительных реакций, чем растения из клубней, хранившихся при обычном режиме 2—3°.

В данном случае любая разница между вариантами достоверна, поскольку сравнивались растения одних и тех же клонов. В 30 клонах сорта Лорх и 13 клонах сорта Гатчинский вирус М был обнаружен серологическим методом только в растениях из клубней, хранившихся при переменной температуре (3—35°).

Известно, что ВТМ передается семенами помидора, однако у молодых растений из семян, зараженных этим вирусом, наблюдаются, как правило, отрицательные реакции или очень небольшой процент положительных реакций, при этом зараженность растений, по данным индикаторной диагностики, намного выше. С целью выявления этой скрытой (для серодиагностики) зараженности был проведен следующий опыт. От помидоров сорта Лучший из всех сорокадневного возраста, которые были выращены из семян, зараженных ВТМ, взяли по одной доле каждого листа. Серологический анализ сока этих долей на ВТМ дал отрицательный результат. Затем с 10 растений стерилизованным инструментом сняли все листья и в пленочном пакете их поместили в холодильник при 3° на 5 сут. По 2 черенка от стебля каждого из 10 растений высадили в автоклавированную почву. Сок листьев, выдержанных 5 сут в холодильнике и затем 1 сут при комнатной температуре, дал положительную серологическую реакцию на ВТМ, а также положительный результат индикаторной диагностики этого вируса.

В растениях из черенков от 6 исходных растений также был обнаружен ВТМ. У 10 контрольных растений, выращенных из той же партии семян в тех же условиях, ВТМ не был обнаружен до конца опыта, т. е. в течение 4 мес от посева семян. Следовательно, при заражении

через семена инфекционный процесс ВТМ в растениях помидора развивается очень медленно, и в тех случаях, когда они находятся в благоприятных условиях, не получают механических повреждений и не имеют контакта с другими растениями, визуальные признаки заражения и серологическая реакция могут не проявляться до конца вегетации. По-видимому, замедленное накопление или блокировка синтеза вируса (возможно, только вирусного белка) вызвана внутренними факторами, может быть, защитными реакциями растения, так как условия среды в наших опытах благоприятствовали накоплению вируса в растениях при искусственном их заражении. Быстро накапливался вирус в растениях и после острых внешних воздействий на них и на отделенные листья (низкая температура, черенкование).

Медленное накопление вирусного антигена и вследствие этого длительное отсутствие серологической реакции наблюдались также у растений помидора, зараженных ВТМ из почвы [5].

Факторы, вызывающие замедление развития вирусной инфекции, пока неизвестны, однако уже сейчас можно сделать некоторые выводы в отношении диагностики вирусов. В тех случаях, когда предполагается наличие «медленной инфекции», необходимы специальные воздействия на растения или другой живой материал (листья, семена, клубни и т. д.) с целью выявления зараженности с помощью серодиагностики. Для вируса М картофеля и ВТМ такими воздействиями могут быть резкие колебания температуры, выдерживание отделенных листьев при пониженной температуре, черенкование растений. По-видимому, диапазон воздействий этим не ограничивается.

Нами рассмотрены лишь некоторые из возможностей улучшения наиболее употребительных методов диагностики — визуального и серологического. Визуальная диагностика может развиваться и совершенствоваться не только путем более точных описаний признаков вирусных болезней в разных условиях, но и с помощью направленных воздействий на растения и посадочный материал, способствующих проявлению симптомов. Серологическая диагностика вирусов возможна во множестве методических вариантов, однако выявление оптимальных вариантов для каждой конкретной задачи требует большой исследовательской работы.

Остается актуальной задача совершенствования капельного метода серодиагностики — самого доступного для широкого практического применения. Наименее изучены вопросы диагностики «дефектных» вирусов и «медленных» инфекций, связанные с основными проблемами современной вирусологии. Так называемые «медленные» инфекции уже в течение нескольких десятилетий известны у зоопатогенных вирусов [9]. Эти инфекции, как и у растений, активизируются при воздействии на зараженные организмы неблагоприятных факторов среды. Пока неизвестно, является ли указанное сходство чисто внешним или в основе этих явлений лежат одни и те же биологические механизмы.

Выводы

1. Достоверность визуальной диагностики вируса скручивания листьев картофеля может быть повышена с помощью декапитации растений и легкой посадки после холодного хранения клубней.

2. Достоверность визуальной диагностики вируса Y на картофеле может быть повышена путем воздействия на клубни резкими колебаниями температуры и обработкой растений растворами сульфата марганца и гипосульфита натрия.

3. Серологический титр вируса X картофеля и ВТМ примерно одинаков в выжатом соке из листьев и экстракте из того же количества листьев в физиологическом растворе (соотношение листьев и раствора

1:1), однако экстракта в этом случае в 2—2,5 раза больше, чем сока, что может иметь значение при анализе небольших растительных образцов.

4. Центрифугирование сока или экстракта для серодиагностики в некоторых случаях целесообразно заменять фильтрацией для удаления грубых взвешенных частиц.

5. У вируса М картофеля и вируса табачной мозаики на растениях помидора возможен замедленный инфекционный процесс при отсутствии в растениях вирусного антигена. Этот процесс сходен с медленными (персистентными) инфекциями у зоопатогенных вирусов. Накопление вируса (или вирусного антигена) может быть вызвано воздействием переменных температур на клубни (вирус М), пониженных температур на листья (ВТМ) и черенкования на растения (ВТМ).

ЛИТЕРАТУРА

1. Вовк А. М. Температурные условия возникновения эпифитотий вируса мозаики и стрика помидоров. «Журн. общей биологии», 1958, т. 19, № 2, с. 139—147.
2. Гиббс Р., Харрисон Д. Основы вирусологии растений. М., «Мир», 1978.
3. Дунин М. С., Попова Н. Н. Капельный метод анализа вирусов в растениеводстве. М., Сельхозгиз, 1937.
4. Кирай З., Клемент З., Шоймоши Ф., Вереш И. Методы фитопатологии. М., «Колос», 1974.
5. Шмыгля В. А. О корневой вирусной инфекции томатов и картофеля. «Докл. ТСХА», 1963, вып. 89, с. 393—399.
6. Шмыгля В. А. Влияние температурных условий хранения клубней на вырождение и вирусные болезни картофеля. В кн.: Вирусные болезни с.-х. растений и меры борьбы с ними. М., «Колос», 1964, с. 137—141.
7. Шмыгля В. А., Кленяев Г. В. Заявка на авт. свидетельство № 2630024/15 от 14/VI—1978 г.
8. Шмыгля В. А., Русинова Е. Я., Лодочкин П. И. Диагностика вируса М картофеля. «Докл. ВАСХНИЛ», 1975, № 6, с. 13—15.
9. Burnet F. M. Principles of animal virology. N. Y., 1955.
10. Henderson H. M., Cooper J. I. "Annals of applied biology", 1977, vol. 86, N 3, p. 389—395.
11. McKinnon J. P., Davies H. T., "Amer. Potato J.", 1967, vol. 44, N 11, p. 409.
12. Jarwood C. E. "Phytopathology", 1958, vol. 48, N 1, p. 21—24.

Статья поступила 4 декабря 1978 г.

SUMMARY

A brief characteristic of the present state in visual and serological diagnostics is presented in the paper, some new tasks and requirements to the technique for detecting and determining the viruses of plants being noted. The reliability of visual diagnostics of leaf roll and Y viruses in potatoes can be increased by affecting plants and tubers in different ways. The application of partially clarified extract allows to increase the sensibility of serodiagnostics of the viruses under drop test. A slowed down infectious process (when there is no viral antigen) which is like "slow" infections in zoopathogenic viruses is one of the causes of the difficulties is serodiagnostics of some viruses.