

В.Т.Хасанов, А.П.Муранец

Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, Астана
(E-mail: vadim_kazgatu@mail.ru)

Изучение способов инокуляции и накопления PVX в тест-растениях

Для мониторинга за пораженными растениями, особенно при латентной инфекции, не выявляемой при визуальном осмотре, необходимы высокочувствительные методы диагностики вирусов картофеля. Одним из основных этапов создания диагностикомов является накопление вирусной инфекции в тест-растениях. В результате исследований установлено, что PVX успешно накапливается на 15-е сутки в растениях *D. stramonium* при нанесении инфекционного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля растения, а в растениях *Nicotiana tabacum* X-вирус — на 30-е сутки при инокуляции карборундом. Изучено цитоанатомическое влияние вирусов на поражённое растение табака. В клетках хлоренхимы, пораженных вирусами растений, наблюдалось уменьшение размеров ядра, увеличивались размеры вакуолей, измельчались хлоропласты. По мере разрушения клеток происходила некротизация тканей. В клетках появлялись кристаллы в виде рафидов.

Ключевые слова: вирусы, картофель, тест-растения, PVX, инфекция.

Введение

PVX, или крапчатая мозаика, — один из наиболее распространенных вирусов картофеля. На многих сортах картофеля вирус не вызывает видимых симптомов, поэтому остается незамеченным. В зависимости от патогенности штамма, вирус может наносить разный вред: слаботоксические штаммы могут снижать урожай на 12 %; сильнопатогенные — на 45 %. Снижение урожайности даже при отсутствии симптомов может достигать 10 %, при мозаике — 45 % [1]. Вирус также может поражать белену, паслен черный, дурман, томат и табак. Идентифицировать вирус можно только лабораторными методами. Распространяется вирус преимущественно при механических контактах с поврежденными растениями, при резке картофеля, через сельскохозяйственные орудия и механизмы при сельскохозяйственных работах (опрыскивание, окучивание и др.). Увеличиваются потери урожая при совместном заражении с вирусами PVY и PVA.

В настоящее время очень актуальна проблема мониторинга вирусных инфекций, результативность которого может быть достигнута только в том случае, когда методы диагностики станут доступны для региональных и производственных лабораторий и будут широко применяться в повседневной практической работе [2]. Для контроля за пораженными растениями, особенно при латентной инфекции, не выявляемой при визуальном осмотре, необходимы высокочувствительные методы диагностики вирусов картофеля. Одним из основных этапов его создания является накопление вирусной инфекции в тест-растениях.

Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии кафедры защиты и карантина растений КАТУ им. С.Сейфуллина в рамках бюджетного грантового финансирования МОН РК по проекту «Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических штаммов».

Целью наших исследований была отработка оптимальных параметров инокуляции тест-растений и накопление X-вируса картофеля.

Материалы и методы

Основными объектами исследований были тест-растения табака (*Nicotiana tabacum*), дурмана (*Datura stramonium*), моноинфицированные X-вирусом растения картофеля сорта Артемис № 43.

Для инокуляции тест-растений были использованы несколько вариантов. При механическом переносе инокуляция проводилась путем растирания тканевого экстракта по верхней стороне листа тест-растения с помощью мелкозернистого абразива — карборунда. Абразив напыляли на поверхность листа перед натиранием или добавляли в инокулюм. После натирания инокулированную поверхность листа промывали водопроводной водой. Использованы были также методы инфильтрации инфекционного сока в листовую пластинку (шприцом без иглы под давлением, нанесение инфекци-

онного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля растения, прививка в расщеп (прививка верхушек моноинфицированных растений *Solanum tuberosum* (привой) к *Datura stramonium* (подвой), укол инфекционного сока в проводящую систему).

При оценке тест-растений на зараженность изучаемым вирусом картофеля применяли коммерческие иммуноферментные тесты. Для определения вирусной инфекции использовался метод двойного наслоения антител («сэндвич-вариант» ИФА). При проведении данного варианта ИФА применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г.Лорха РАСХН (п. Коренево) [3]. Срезы тканей растений картофеля делали с помощью салазочного микротомы, окуляр-микрометром определялись длина устьиц, размеры клеток хлоропласты [4; 56–103].

Обсуждение результатов

Первоначальным этапом создания иммуноферментной диагностической тест-системы для детекции вирусной инфекции является накопление отдельных вирусов в тест-растениях с целью получения высокоочищенного вирусного препарата.

Известно, например, что для накопления X-вируса картофеля можно использовать растения *Datura stramonium*, *Chenopodium*, *Nicotiana tabacum*, *Homphrena* и др. [5, 6]. Из нескольких видов и сортов растений, использованных при изучении способов оптимальной инокуляции и накопления вирусной инфекции, нами были отобраны для работы дурман, картофель сорта Артемис и табак сорта Самсун, иммунный к ВТМ и мучнистой росе.

В лаборатории биотехнологии растений кафедры защиты и карантина растений КАТУ им. С.Сейфуллина были высеяны семена тест-растений и определена их лабораторная всхожесть (табл. 1).

Таблица 1

Лабораторная всхожесть семян тест-растений

Культура	Всхожесть семян, %
<i>Nicotiana tabacum</i>	65,0
<i>Datura stramonium</i>	57,0
m%	2,30
НСР	4,84

Согласно данным таблицы 1, лабораторная всхожесть изучаемых видов растений находилась в пределах 57–65 % (рис.1).

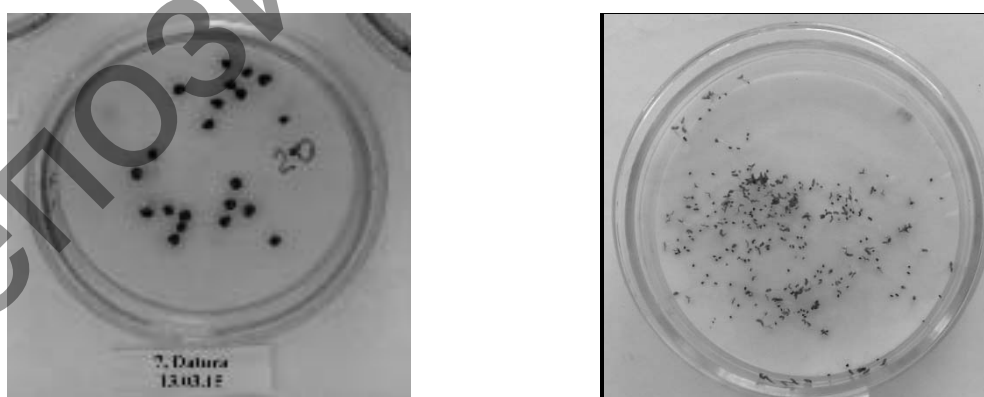


Рисунок 1. Определение лабораторной всхожести семян тест-растений

На тест-растениях, зараженных штаммом PVX, через две недели появлялись ярко выраженные симптомы в виде крапчатой пятнистости, морщинистости листьев, первичной и вторичной некролизации.

На молодых листьях образовывалась светло-зеленого цвета мозаика, т.е. пятна разной интенсивности, величины и формы. В проведенных нами цитологических исследованиях было выявлено, что в клетках эпидермиса листьев, поражённых PVX, наблюдалось измельчение клеток. На срезах

листьев, поражённых вирусной инфекцией, заметно уменьшение количества слоёв столбчатой и губчатой паренхимы. Объём межклеточников губчатой хлоренхимы снижался, палисадные клетки укорачивались, некоторые теряли свою вертикальную ориентацию, при этом мезофилл уплотнялся, толщина листа уменьшалась. В клетках хлоренхимы, поражённых вирусами растений картофеля, наблюдалось уменьшение размеров ядра, увеличивались размеры вакуолей. Размеры хлоропластов в поражённых вирусами листовых пластинках измельчались. Количество хлоропластов в клетках снижалось по сравнению с клетками здоровых растений, подобные изменения наблюдались нами и при изучении поражения растений PVY [7]. По мере разрушения клеток происходила некротизация тканей. В клетках появлялись кристаллы в виде рафидов.

Патологические изменения происходили и в жилках листьев, наблюдалось их недоразвитие, утолщение клеточных оболочек, измельчение клеток колленхимы. На некоторых растениях в процессе старения пятна постепенно исчезали, таким образом вирус переходил в латентную, бессимптомную форму.

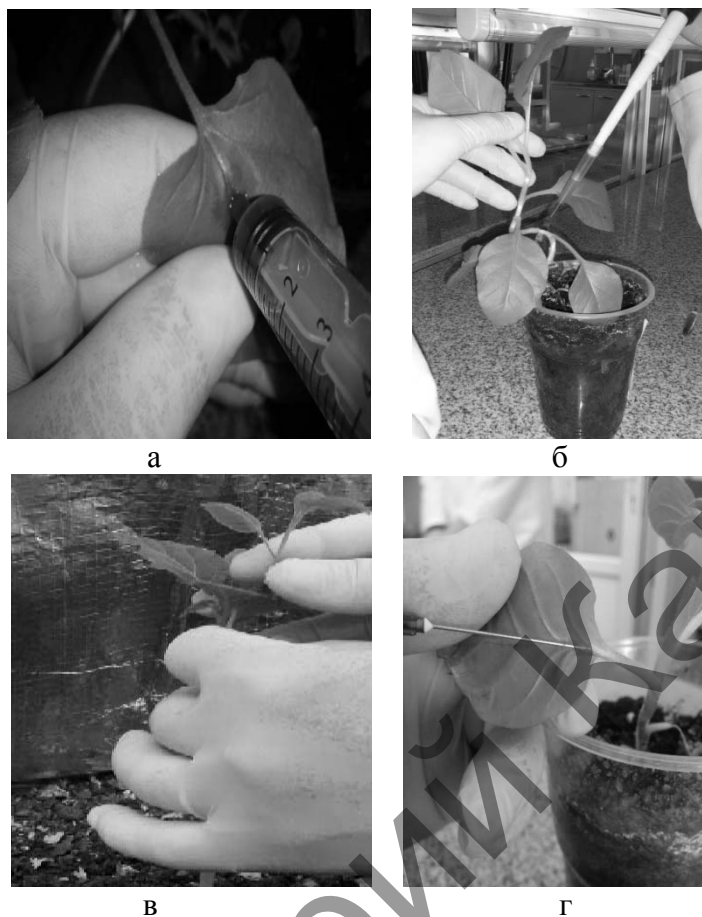
Как известно, для выделения вирусов картофеля из растений-накопителей обычно используются листовые материалы [4]. Поэтому на этапе накопления вирусной инфекции важно получить максимум вегетативной массы растений за короткий период.

В этой связи из полученных ботанических семян, в соответствии с рисунком 2, была выращена рассада тест-растений и проведена их пикировка.



Рисунок 2. Пикировка рассады *D. stramonium*

Далее, в соответствии с рисунком 3, проводили изучение способов инокуляции тест-растений различными вирусами картофеля.



а — шприцом без иглы под давлением;
 б — нанесение инфекционного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля растения;
 в — укол инфекционного сока в проводящую систему; г — с помощью карборунда

Рисунок 3. Инокуляция тест-растений инфекционным соком моноинфицированных вирусами растений картофеля различными способами

После инокуляции тест-растений изучали динамику накопления вирусов картофеля на 15–40-е сутки. Следует отметить, что листовые пробы, использованные для проверки вирусной инфекции в разные сроки, хранились при +4°C и были протестированы одновременно. Исходная относительная концентрация изучалась в «сэндвич-варианте» ИФА в единицах оптической плотности (экстинции) — о.е. (табл. 2).

Таблица 2

Динамика накопления X-вируса картофеля в успешно инокулированных тест-растениях, «сэндвич-вариант» ИФА

Тест-растение, вид/сорт	№ тест-растения	Источник инфекции, сорт, клон	Способ инокуляции	Состав буферного раствора	Экстинция A ₄₉₂ , о.е. сутки		
					15-е	30-е	40-е
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>D. stramonium</i>	1	Артемис № 43	Прививка	-	0,650	0,572	0,621
	7	Артемис № 43	Разрез	КФБ, рН=7,4	1,700	1,328	1,416
Positive	-	-	-	-	1,870	1,870	1,870
Negative	-	-	-	-	0,013	0,013	0,013
<i>Nicotiana tabacum</i>	203	Картофель in vitro ВНИИКХ им. А.Г.Лорха	Карборунд	КФБ, рН=7,4	0,010	0,078	0,212

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
Positive	-	-	-	-	0,238	0,238	0,238
Negative					0,008	0,008	0,008

Как видно из данных таблицы, растения *Nicotiana tabacum* при механической инокуляции карборундом накапливали вирусную инфекцию на 30-е сутки.

Известно, что основным показателем, влияющим на выход вирусного препарата, является титр вируса в инфекционном соке тест-растения.

В этой связи на заключительном этапе наших исследований определялся рабочий титр PVX в инфекционном соке инокулированных тест-растений *Datura stramonium* и *Nicotiana tabacum* в «сэндвич-варианте» ИФА (табл. 3).

Таблица 3

Результаты изучения рабочих титров вирусов картофеля в инокулированных тест-растениях в «сэндвич-варианте» ИФА

Вирус	Тест-растение	Титр вирусов в тест-растениях																
		Native	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	
PVX	<i>D.stramonium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>N. tabacum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Как видно из таблицы 3, наиболее высоким титром со специфическими антителами в ИФА обладал сок растения-накопителя PVX — *D. stramonium*.



Рисунок 4. Полученные вегетативные гибриды «Дурманокартофеля» с симптомами PVX на нижних листьях на 7-е сутки после прививки в расщеп



Рисунок 5. Инокуляция в разрез стебля растения *D. stramonium* с симптомами PVX на 15-е сутки

Как видно из рисунков 3 и 4, растения *Datura stramonium* были успешно заражены PVX при использовании обоих способов инокуляции: прививкой и в разрез стебля. Однако на варианте с прививкой (рис. 4) симптомы начинали появляться уже через неделю на нижних листьях растения как и в случае с прививкой картофеля инфицированного PLRV к дурману (рис. 5), и затем уже на 30-е сутки — на верхних листьях отросшего под привоем побега. Изменение окраски нижних листьев *D. stramonium* может быть связано с оттоком органических веществ привоя к подвою. В случае инокуляции PVX в разрез стебля, в соответствии с рисунком 4, симптомы уже проявлялись на 5-е сутки на молодых листьях нового побега, что подтверждалось также высокой экстинцией в ИФА в данный период.

Выводы

На основании проведенных исследований необходимо сделать следующие выводы:

1. Установлено, что PVX успешно накапливается на 15-е сутки в *D. stramonium* при нанесении инфекционного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля растения. В растениях *Nicotiana tabacum* X-вирус накапливается на 40-е сутки при инокуляции карборундом.

2. Действие вирусов на поражённое растение табака проявлялось в уменьшении размеров клеток покровных тканей, изменением их структуры. В клетках хлоренхимы, поражённых вирусами растений, установлено уменьшение ядер, увеличение размеров вакуолей, измельчение хлоропластов. По мере разрушения клеток происходит некротизация тканей листьев, появляются кристаллы в виде рафидов.

Список литературы

- 1 Амельюшкина Т.А., Семешкина П.С. Защита семенных посадок картофеля от вирусных болезней // Защита и карантин растений. — 2011. — № 3. — С. 21–23.
- 2 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. — М.: Наука, 1993. — 301 с.
- 3 Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. — М.: Агропромиздат, 2000. — 76 с.
- 4 Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.
- 5 Николаева О.В. Современные иммунологические методы в массовой диагностике вирусов растений: обзорная информация. — М.: Наука, 1986. — 52 с.
- 6 Бобкова А.Ф., Чирков С.Н. Применение иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний картофеля: обзор // Сельскохозяйственная биология. — 1983. — № 5. — С. 32–35.
- 7 Хасанов В.Т., Муранец А.П., Оразбаева Г.К., Букаев А. Инокуляция, накопление и идентификация вируса PVY картофеля в тест-растениях *Nicotiana tabacum* // Вестн. КАТУ им. С.Сейфуллина. — 2012. — № 4 (75). — С. 31–36.

В.Т.Хасанов, А.П.Муранец

Инокуляция әдістерін және тест-өсімдіктерде PVX жинақталуын зерттеу

Өсімдіктердің инфекциялық аурулармен зақымдалғандығына мониторинг жүргізу үшін, ауруды визуалды әдіспен нақты анықтай алмаған жағдайда, картоп вирусына сезімталдығы жоғары диагностикалық әдістерді қолданған тиімді. Диагностиканы жасаудың негізгі кезеңдерінің бірі тест-өсімдіктерде вирустық инфекцияны жинақтау болып табылады. Зерттеудің нәтижесінде сабақты кесіп орналастырған сүзгі қағазына инфекциялық шырынды енгізу әдісі арқылы жұқтырылған X-вирусы *D.Stramonium* өсімдігінде 15-тәулікте, ал *Nicotiana tabacum* өсімдігіне карборунд ұнтағын қолдана отырып жұқтырылған X-вирусы 30-тәулікте жинақталатыны анықталды. Зақымдалған өсімдіктерге вирустардың әсерін анықтау үшін цитоанатомиялық зерттеу жүргізілді. Бұл өсімдік клеткаларының ядросы кішірейіп, вакуоль көлемінің үлкейіп, хлорокабаттардың ұсақталып кететіні байқалды. Клетканың бұзылуымен қоса ұлпада некротиздану жүрген және клеткаларда рафид түріндегі кристалдар пайда болған.

V.T.Khassanov, A.P.Muranets

The study of inoculation methods and accumulation of PVX in the test plants

This paper shows necessity of using highly sensitive diagnostic methods potato viruses, especially when potato has latent infection, which is not detectable upon visual inspection. One of the main steps of creating diagnostics is the accumulation of viral infection in the test plants. The studies found that PVX successfully accumulates on the 15 th day in *D. stramonium* plants when applied infectious juice on filter paper in a longitudinal section of the stem of the plant, and plant *Nicotiana tabacum* X-virus accumulates on the 30 th day, when inoculated with carborundum. The article analyzes the cytoanatomical impact of viruses on the affected tobacco plants. In the hlorenhima cells infected by plant viruses we observed a decrease in the size of the kernel, increases the size of the vacuoles, chloroplasts were shredded. A necrotic process in the tissue has been found as a destruction of the cells went by. In the cells has been found crystals in the rafid form.

References

- 1 Amelyushkina T.A., Semeshkina T.S. *Plant protection and quarantine*, 2011, 3, p. 21–23.
- 2 Gnutova R.V. *Serology and Immunochemistry plant viruses*, Moscow: Nauka, 1993, 301 p.
- 3 Simakov Ye.A., Uskov A.I., Varitsev Yu.A. *New technologies of production of the improved starting material in elite Seed Potato: Recommendations*, Moscow: Agropromizdat, 2000, 76 p.
- 4 Pausheva Z.P. *Plant cytology Workshop*, Moscow: Agropromizdat, 1988, 270 p.
- 5 Nikolayeva O.V. *Current immunological methods in mass diagnosis of plant viruses: an overview*, Moscow: Nauka, 1986, 52 p.
- 6 Bobkova A.F., Chirkov S.N. *Agricultural biology*, 1983, 5, p. 32–35.
- 7 Khasanov V.T., Muranets A.P., Orazbayeva G.K., Bukayev A. *Bull. of S.Seyfullin KATU*, 2012, 4 (75), p. 31–36.