

## THE SUNFLOWER VIRAL DISEASES DIAGNOSTICS.

G.S.Litvinov, N.A.Knyazeva, E.A.Kondratjuk, S.A.Smirnova and  
A.L.Boiko  
Department of Virology, Biological Faculty, Kiev State University,  
Vladimirskaya 64, 252017 Kiev, SSSR

## SUMMARY

With the complex of methods the sunflower diseases causing by viruses were investigated. The numerous virus-like pathologies of the naturally infected sunflower plants had systematized into three main groups: pathology of colour, deformation of leaves and degeneration of the different organs of plants. The transmission of the infection by native and purified sap of the diseased sunflower plants were studied using 34 species of 17 families. The sensitive host range included 20 species from 12 families among which there were Compositae, Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Amaranthaceae, Fabaceae, Solanaceae, Malvaceae and some others. Serological diagnostics pointed to the presence of different antigens which are related to the phytoviruses of several taxonomical groups. In the purified diseased plant sap preparations for the electron microscopy there were found virions of three different morphological groups: icosahedral, rigid-rod-like and flexuous rod virions. These virus particles may be attributed to cucumoviruses, tobamoviruses and carlaviruses groups consequently.

## ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИКА

## РЕЗЮМЕ

С помощью комплекса методов исследованы болезни подсолнечника, вызываемые вирусами. Отмечены многочисленные вирусоподобные патологии, естественно инфицированных растений подсолнечника, систематизированные в три основные группы: патологии цвета, деформации листьев и редукции различных органов растений. Для определения круга растений-хозяев изучены 34 вида растений из 17 семейств, из них чувствительными оказались 20 видов из 12 семейств, среди которых Compositae, Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Amaranthaceae, Fabaceae, Solanaceae, Malvaceae и другие. Серологическая диагностика указала на присутствие различных антигенов, родственных фитовирусам нескольких таксономических групп. В препаратах для электронной микроскопии из очищенного сока растений обнаружены икосаэдрические, жесткие палочковидные и нитевидные вирионы, которые могут быть отнесены к группам кукумо-, тобамо- и карлавирусов, соответственно.

## ВВЕДЕНИЕ

Фитопатология инфекционных болезней подсолнечника, важнейшей масличной культуры, для многих стран мира /СССР, Аргентина, Китай, Венгрия и др./, в настоящее время развивается преимущественно в направлении исследований грибных и бактериальных инфекций. В то же время, до сих пор у подсолнечника явно недостаточно изучаются вирусные болезни, недооценка вредности и эпифитотического характера которых может приводить к значительным потерям урожая. До сих пор отсутствуют не только исследования молекулярно-биологического уровня, но и не проведена систематизация внешних прояв-

лений вирусных инфекций, что зачастую приводит к невозможности аналитического сравнения ранее опубликованных и публикуемых результатов по вирусологии подсолнечника в разных регионах мира. Явно неполные данные имеются также по свойствам возбудителей вирусозов подсолнечника, в частности, не изучены их биохимические и биофизические характеристики, что во многом обусловлено значительными трудностями в выделении и накоплении. Целью данной работы было систематическое изучение вирусных и вирусоподобных патологий подсолнечника, культивируемого в разных почвенно-климатических зонах СССР.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на протяжении 1979–1987 г.г. на посевах подсолнечника *Helianthus annuus* L. различных сортов в открытых биоценозах. Растения с патологиями, характерными для вирусных болезней /мозаичность, пятнистость, гофрировка и скручивание листьев, уродливость и деформации, карликовость растений/, фотографировали и описывали, измеряли их высоту, количество пар листьев, выборочно определяли зеленую массу растений и другие параметры, отклонения в которых от нормы могут служить признаками вирусной инфекции. Распространенность конкретного симптома в группе вирусных вычисляли как отношение числа растений с данным симптомом к общему числу растений с различными вирусными симптомами. Листья и семена от образцов инфицированных растений контролировали на вирусносительство иммунологически, с помощью электронной микроскопии сока и ультратонких срезов ткани и с использованием растений-индикаторов /Hibbs, Harrison, 1976 /. Иммунологические реакции проводили с использованием диагностических сывороток к вирусам табачной мозаики /обыкновенный штамм/, стандартные антисыворотки, специфичность которых предварительно контролировалась. Анализ проводился различными иммунологическими методами: капельной преципитацией, кольцепреципитацией, двойной иммунодиффузией в агаре по Ухтерлони, твердофазным иммуноферментным методом на микроплатах и иммуносорбентной электронной микроскопией. Приготовление препаратов для иммуносорбентной электронной микроскопии проводили по общепринятой методике /Shikata и Kojima, 1978 / с применением формваровой подложки и негативным контрастированием 2% фосфорновольфрамовой кислотой. Негативная электронная микроскопия нативного и очищенного сока и электронная микроскопия в ультратонких срезах осуществлялись в соответствии с методиками, описанными Бирюзовой и др. /1963/. В экспериментах по методу растений-индикаторов исследовался спектр восприимчивых растений с передачей инфекции с подсолнечника механической инокуляцией соком на растения 34 видов, 17 семейств.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследований внешней симптоматики был обнаружен широкий спектр вирусоподобных патологий формы, окраски, роста и развития семядольных и настоящих листьев и растения в целом. Распространенность симптомов вирусных инфекций исследованных в агроценозах приведена в таблице I. Следует отметить, что, помимо патологий приведенных в таблице I, отмечаются целый ряд сопутствующих аномалий. В частности, наблюдались поперечное и кольцевидное скручивания листовых пластинок, нитевидность и ланцетовидность листьев, редукция и удлинение верхушки листа, посветление и набухание жилок, задержка роста и карликовая уродливость растений. Комбинирование патологий зависело от сорта и условий культивирования.

Таблица I. Симптомы вирусных болезней подсолнечника в агроценозах

Внешние симптомы	Распространенность, % к общему числу симпто- мов различных типов
Хлоротичная мозаичность /желтая мозаика/	8-10
Хлоротичная пятнистость листьев	50-60
Израстание листьев /края и верхушки/	5-8
Курчавая деформация листьев	40-50
Гофрировка и вздутия листьев	25-40
Редукция листьев	3-5
Некротическое поражение листьев	8-10
Деградация верхушки растения	0,5-1
Темно-зеленая пятнистость	1-3
Деформация венчика	1-3

Перечисленные в таблице I вирусные болезни снижали урожай зеленой массы подсолнечника в среднем на 20-25%, а также ухудшали качество семян, которые зачастую оказывались неполноценными, сморщенными, уменьшая при этом их урожайность на 17-20%.

Проведен иммунологический анализ нативного сока листьев подсолнечника с антисыворотками к вирусам, наиболее распространенным в культурных фитоценозах. Анализировали также сорняки, находящиеся в посевах подсолнечника в обследованных зонах.

В исследуемом материале вирус табачной мозаики обнаруживали с использованием всех испытанных иммунологических методов, кроме преципитации в капле, чувствительность которого оказалась недостаточной для данных условий. В реакции кольцепреципитации средний титр составил 1:20, двойной иммунодиффузии - 1:16, иммуносорбентном анализе - 1:2048. Наибольшую чувствительность показал иммуноферментный метод, позволивший обнаружить вирусную инфекцию с титрами / 1 : 1024 - 2048/,  $10^6$  превышали титры остальных реакций. Титр антигена в положительных реакциях иммуноферментного анализа со стандартными антисыворотками к вирусам группы карлавирусов и потексвирусов был различным. Так, с антисыворотками к карлавирусам титры находились в интервалах 1:20 - 1:2560 и 1:10 - 1:160, а потексвирусов - 1:20 - 1:320. Электронно-микроскопическое исследование возбудителей показали, что многообразие симптомов связано с тем, что подсолнечник может одновременно поражаться по меньшей мере 5-6 вирусами, относящимися к различным пространственно-морфологическим типам. Среди них: жесткие палочковидные вирионы размером 280-300 нм x 18-19 нм с внутренним каналом 3,5 нм; гибкие нитевидные частицы размером 650-750 нм x 11-12 нм с внутренним каналом 2,5 нм, изометрические частицы с размерами от 28 до 32 нм. На электронографиях ультратонких срезов ткани листьев подсолнечника обнаружены значительные патологии ультраструктуры клеток и клеточных органелл: отслоение плазматической мембраны от клеточной стенки, деформации пластид, вакуолизация цитоплазматической оболочки и хлоропластов и другие. В инфекционном материале растений с симптомами деградации и ветвления верхушки наблюдалось накопление в ядре сферических частиц размером 26-32 нм, подобные вирусы локализовались также в плазмодесмах и вблизи них.

Таблица 3. Спектр растений, восприимчивых к передаче вирусной инфекции соком зараженных растений подсолнечника

Семейство	Вид растения-индикатора	Симптомы инфекции
Ranunculaceae	<i>Delphinium consolida</i> L.	Краевое пожелтение листа
Urticaceae	<i>Urtica urens</i> L.	Некрозы, вздутия на листовой пластинке, хлоротичность листьев нижних ярусов
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i> L. <i>Ch. amaranticolor</i> Coste et Reyn.	Израстания, энации, скручивание и краевое пожелтение листа, карликовость растений
Aizoaceae	<i>Tetragonia expansa</i> Murr.	Хлоротичная пятнистость, хлороз и скручивание листа
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Хлоротичная мозаика, вздутия листа у основания, пожелтение и деформация края листа.
Brassicaceae	<i>Brassica sylvestris</i> (L) Mill.	Краевое пожелтение, скручивание и некротическое усыхание листовой пластинки
Malvaceae	<i>Malva rotundifolia</i> auct.	Хлоротичная мозаика, просветление жилок, пожелтение листьев нижнего яруса.
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.  <i>Ph. multiflorus</i> Wild.	Хлороз, вздутия и гофрировка листьев, некрозы, загибание листа внутрь. Светло-зеленая мозаика верхнего яруса листьев, энации, вздутия, гофрировка, израстание листа.
Lamiaceae	<i>Vicia sativa</i> L. <i>Salvia sclarea</i> L. <i>Leonurus quinquelobatus</i> Gilib.	Загибание края листа внутрь. Краевое пожелтение листа, хлоротичная мозаика. Энации, деформация и скручивание верхушечных листьев
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i> L.  <i>Nicotiana Debney</i> L. <i>N. rustica</i> L.  <i>N. clevelandii</i> A. <i>Capsicum annuum</i> L.  <i>Petunia hybrida</i> L.	Гофрировка листьев, краевое пожелтение листа. Прижилковая гофрировка листа. Деформация, гофрировка и израстание листьев. Деформации листьев. Краевое пожелтение и усыхание листа. Краевое просветление, скручивание листа внутрь, точечные некрозы.
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.	Некротическое усыхание листьев нижнего яруса.
Asteraceae	<i>Cineraria maritima</i> L.  <i>Galinsoga parviflora</i> Cav.	Скручивание листовой пластинки вверх. Некротическая пятнистость, пожелтение и деформация листа.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты согласуются с ранее опубликованными. Симптомы, сходные с некоторыми из наблюдавшихся нами обнаруживались Soriano /1932/, Muntanola /1948/, Delhey, Kiehr, Delhey /1974/ и другими исследователями в Аргентине; Weber /1932/, Orellana и Quacquarelli /1968/ - США; Целле /1932/, Ягодкиной /1948/ и Рыжковым /1946/ - в СССР; Uppal /1933/, Battu и Phatak /1965/, Gupta K. и Gupta M. /1977/ - в Индии; Arnott и Smith /1967/, Russell и др. /1974/ - в Англии; Viltshire /1955/ - в Африке; Dijkstra /1983/ - в Нидерландах; Pop /1986/ - в Румынии; Connors /1967/ - в Канаде. С выводами Dijkstra /1983/ и Smith /1972/ частично совпадают наши данные по изучению спектра чувствительных растений. Обнаруженное нами серологическое родство антигенов в соке больных растений с другими фитовирусными антигенами находится в соответствии с выводами о чувствительности подсолнечника ко многим фитовирусам различных таксономических групп /Klinkowski, 1977/. О комплексности вирусных инфекций подсолнечника свидетельствует и наблюдавшийся нами широкий спектр симптомов. Результаты электронномикроскопических исследований также подтверждают работы других авторов. Так, Arnott и Smith /1967/ установили наличие в цитоплазме вирусных частиц размером 480 X 13 нм, отнесенных ими к потивирусу. Вирусы подсолнечника в различных областях Аргентины вызывались нитевидными вирусами длиной 635 нм /Munoz et al., 1981/ и 750 нм /Kiehr-Delhey и Delhey, 1985/. Некротическое поражение и курчавость листьев верхушки, подобные описанной нами, могут быть следствием инфекции штаммом изометрического вируса стрика табака размером около 30 нм /Dijkstra, 1983/. Хлоротичная пятнистость и мозаичность листьев, карликовость растений и морщинистость семян могут быть связаны с репродукцией вируса, являющегося штаммом изометрического вируса мозаики огурца /Orellana и Quacquarelli, 1968/. Неидентифицированный изометрический вирус вызывал также хлороз жилок и пятен на листьях подсолнечника в агроценозах Румынии /Pop, 1986/.

## ВЫВОДЫ

Из проведенных исследований и анализа литературы можно сделать следующие выводы:

- вирусные инфекции широко распространены во многих регионах земного шара и оказывают значительное негативное влияние на габитус подсолнечника, вызывая патологии ультраструктур клеток, многочисленные изменения формы, поверхности и окраски листьев, роста и развития растений, снижение урожая;

- вирусные инфекции подсолнечника носят комплексный характер и вызываются разнообразной по морфологическим и биологическим свойствам популяцией вирусов, что требует применения широкого комплекса диагностических методов и подходов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. БИРЮЗОВА В.И., 1963, Электронно-микроскопические методы исследования биологических объектов. Москва, Наука, 285.
2. РЫЖКОВ В.Л., 1946, Фитопатогенные вирусы, Москва, Наука, 154-155.
3. ЦЕЛЛЕ М.А., 1932, Болезни подсолнечника, Ленинград, 14-16.
4. ЯГОДКИНА В.П., 1948, Вирусные болезни масличных культур. В кн.: Вирусные болезни растений, АН СССР, Москва, 228-229.

5. ARNOTT H., SMITH K.M. 1967. Electron Microscopy of virus-infected sunflower leaves. J. of ultrastructure research, 19; 173-195.
6. BATTU A.N., PHATAK H.C. Observation on a mosaic disease of sunflower. Indian Phytopathology, v.28, N3, 317.
7. DELHEY R. and KIEHR-DELHEY M. 1974. Un virus del girasol en el sudeste bonaerense. Resúmenes, 2 2da. Reunion Nacional de Girasol, Buenos-Aires, 9-11 octubre.
8. DIJKSTRA J. 1983. Tobacco streak mosaic virus in sunflower (Helianthus annuus L.) Nethl. J. Pl. Pathol., v.89, N4; 153-169.
9. CONNERS J.L. 1967. An annotated index of plant diseases in Canada, Ottawa, Canada, 130.
10. GIBBS A., HARRISON B. 1976. Plant Virology. The principles., Eduard Arnold, London.
11. GUPTA K.C., GUPTA M.N. 1977. Viral diseases of sunflower (Helianthus annuus L.) New record from India Curr. Sci., v.46, N8, 285.
12. KLINKOWSKI M. 1977. Pflanzliche virologie, v.3, 105-106.
13. MUNOZ L., GIORDA L., TESSANDIER E. and LENARDON S. 1981. Una virosis del girasol (Helianthus annuus L.) en la República Argentina. Resúmenes. IV Jornadas Fitosanitarias Argentina, Cordoba, 19-21 de agosto, 31-32.
14. MUNTANOLA MARIA, 1948. Descripción de una nueva enfermedad del Girasol (Helianthus annuus L.) Rev. Invest. Agric. Buenos Aires, v.2, 205-212.
15. ORELLANA R.C., QUACQUARELLI A. 1968. Sunflower Mosaic caused by a strain of Cucumber mosaic virus. Phytopathology, v.58, N 10, 1439-1440.
16. POP S.V., 1986. Preliminary researches of a new virus disease of sunflower (H.A.L.) in Romania Recent results in Plant Virology, Summaries Symposium held in Castle of Reinhardtsbrunn DDR. March, 23-27.
17. RUSSELL G.E., COOK P.H.L., BUNTING E.S. 1975. An aphid-transmitted yellowing virus disease of sunflower. Plant Pathology, v.24, N1, 58-59.
18. SHIKATA E., KOJIMA M. 1978. Immune electron microscopy of plant viruses. Ann. Phytopathol. Soc. Jap., v.44, 28-32.
19. SORIANO S., 1932. Nota sobre algunas enfermedades de los vegetales production por virus en la República Argentina. Physis, v. 11, N 1. 87-92.
20. UPPAL B.N. 1933. Intern. Bull. Plant Prot: 103-104.
21. WEBER G.F. 1938. Mosaic, a virus disease of many plants. Florida Growers, v.40, N 12, 10-11.
22. WILTSHIRE S.P., 1955. Plant diseases in British Colonial Dependencies: a half-early report. F.A.O. Plant Protection Bull., v.3, N 9, 140.