

**Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по земледелию**

**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ДОЧЕРНЕЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ
«ОПЫТНАЯ НАУЧНАЯ СТАНЦИЯ ПО САХАРНОЙ СВЕКЛЕ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДИАГНОСТИКЕ
ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ В ПОСЕВАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ**

Несвиж
Несвижская укрупненная типография им. С. Будного
2018

УДК

Рекомендации подготовлены коллективом РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле» в составе:

И. В. Чечеткина, зав. отделом агротехники сахарной свеклы

М. И. Гуляка, ведущий научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук

С. Н. Гайтюкевич, кандидат сельскохозяйственных наук

Е. М. Кашевич, научный сотрудник

Е. А. Шкраба, младший научный сотрудник

В. С. Шкут, младший научный сотрудник

Рекомендации предназначены для специалистов свеклосеющих хозяйств и сырьевых отделов сахарных комбинатов

ISBN

Оглавление

Введение.....	4
1. Биологические особенности возбудителей вирусных заболеваний, симптомы поражения растений сахарной свеклы	5
2. Методика обследования посевов сахарной свеклы, отбор проб и подготовка материала для проведения анализа.....	8
3. Методика проведения иммуноферментного анализа	10
4. Рекомендации производству	12
5. Литература	13

Введение

Сахарная свекла – одна из наиболее ценных технических культур, возделываемых в качестве сырья для сахарной промышленности. В последние годы с увеличением площадей под сахарной свеклой и ростом их удельного веса в структуре севооборотов значительно повысилась вероятность распространения вредоносных вирусных заболеваний. Это было вызвано несоблюдением севооборотов и широким возделыванием генетически однородных сортов и гибридов. В большинстве случаев вирусные заболевания не приводят больных растений к гибели, их действие проявляется в снижении урожая и сахаристости корнеплодов, а также отрицательно влияют на семенной материал [12].

Так, вирус желтухи способствует снижению массы корнеплодов до 30%, массы листьев - до 10%, потери сахара при сильном поражении могут достигать 5% и выше. При заболевании мозаикой разница в урожайности корнеплодов больных и здоровых растений бывает незначительная, однако процент содержания сахара может понизиться на 0,8-1,7% [2,5]. Сильное поражение растений сахарной свеклы ризоманией способно привести к потерям урожайности на 50% и более, при этом сахаристость корнеплодов снижается на 6-8% [13].

Вирусные заболевания оказывают отрицательное влияние на семеноводство сахарной свеклы. При сильном поражении растений желтухой или мозаикой заметно снижается продуктивность семенников, масса семян становится ниже в среднем на 40%. Кроме того, на таких растениях заметно снижается количество крупных клубочков и значительно увеличивается число мелких [2].

В Республике Беларусь сведения о наличии вирусных заболеваний на сахарной свекле были ограничены лишь отдельными сообщениями, целенаправленной идентификации на наличие вирусов не проводилось.

Выявление вирусных заболеваний методом иммуноферментного анализа в условиях Республики Беларусь позволит получить более глубокие представления о структуре популяции вирусов в регионе и определить их распространенность в посевах сахарной свеклы. В то же время оценка отечественных селекционных номеров и линий на устойчивость к возбудителям вирусных заболеваний позволит отобрать наиболее перспективные для дальнейшего их использования в селекционном процессе.

Таким образом, проведение целенаправленных исследований о распространенности вирусных болезней, идентификации их возбудителей и разработке методов диагностики является актуальным.

1. Биологические особенности возбудителей вирусных заболеваний, симптомы поражения растений сахарной свеклы

Вirus пожелтения листьев сахарной свеклы. Установлено два вируса, вызывающих желтуху: суровую или некротическую форму (Beet yellow virus) и слабое пожелтение (Beet mild yellowing virus) [3].

Внешне желтуху трудно отличить от различных форм хлорозов, вызываемых неблагоприятными условиями внешней среды.

Первые симптомы некротической желтухи проявляются в фазе 2-5 пар настоящих листьев сахарной свеклы в виде осветления или пожелтения жилок. Эти листья вырастают карликовыми, жилки у них сморщиваются. У более старых листьев, обычно начиная с верхней части, появляются желтые, слабо ограниченные пятна. Впоследствии пожелтение охватывает всю пластинку листа, распространяясь от верхушки к центру. Иногда лист приобретает бронзовый или красный оттенок. Ткани вдоль жилок листа и у его основания долго остаются зелеными. Пораженные листья становятся утолщенными, кожистыми, более хрупкими, при сдавливании в руке они крошатся и можно различить характерный «хруст». Позднее в местах пожелтения листьев между жилками появляются некротические пятна, а затем и вся пластинка преждевременно отмирает. Желтуха обычно проявляется на листьях нижнего и среднего ярусов розетки (рис. 1) [1,2,4,10].



Рис. 1. Симптомы поражения желтухой

При поражении свеклы вирусом слабого пожелтения проявляются такие же симптомы, как и при суровой желтухе, но пожелтение менее выражено и не наблюдается гравировки листьев.

В зимнее время вирусы желтухи сохраняются в корнеплодах маточной, а также случайно зимующей в поле свекле. Источником инфекции также могут быть растения дикой свеклы, некоторые виды сорняков: лебеда, щирица, вьюнок, осот полевой, пастушья сумка и другие. Через семена вирус не передается. От больных к здоровым растениям вирус переносится в основном сосущими насекомыми, такими как: зеленая персиковая (*Myzodes persicae* Sulz) и черная свекловичная (*Aphis fabae* Scop.) тли [2,3,4,10].

Вир​ус​ мозаи​ки​ са​хар​ной​ свек​лы (Beet mosaic virus). Вирус поражает в большей степени семенники, однако часто подвержены заражению растения свеклы первого года жизни. Признаки болезни лучше заметны на молодых листьях при просматривании их на свет. Симптомы проявляются в виде мраморности, мозаичного рисунка, возникающего при появлении своеобразных светлоокрашенных пятен, заметных на фоне темно-зеленой здоровой части листа. Пятна бывают различной формы и величины, могут быть точечными, округлыми, кольчатыми, лопастными, в виде звездочек и т.д. Иногда наблюдается форма мозаичности в виде полосок или сетчатого рисунка, соответствующего сетке жилок (рис. 2). На пораженных листьях иногда возникают зеленые вздутия, окруженные хлоротическими участками, пластинка листа становится искривленной. Мозаичные растения отстают в развитии, могут приобретать карликовый вид. У взрослых растений сахарной свеклы признаки заболевания часто маскируются. Мозаичность охватывает целиком все растение, т.к. вирус размножается только в его клетках [1,2,4,10].



Рис. 2. Поражение мозаикой

Распространяется вирус сосущими насекомыми, преимущественно тлями: зеленой персиковой (*Myzodes persicae* Sulz) и черной свекловичной (*Aphis fabae* Scop.). В роли переносчика также отмечают свекловичного клопа (*Polymerus cognatus* Fieb.) и цикадок [2,4,8].

В зимнее время вирус мозаики сахарной свеклы сохраняется в корнеплодах маточной, в растениях безвысадочной или случайно зимующей свеклы. Поэтому весной первые очаги мозаики появляются на отрастающих розетках зараженных корнеплодов. С этих больных растений насекомые переносят вирус как на соседние здоровые семенники, так и на свеклу первого года [2].

Ризомания, или вирус некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (Beet necrotic yellow vein virus). Болезнь проявляется очень рано – в фазе развития у свеклы 2-3 пар листьев. У заболевших растений листья приобретают бледно-зеленую, салатовую, лимонно-желтую окраску, становятся прозрачными, прямостоячими с удлиненными черешками. Специфичным

признаком данного заболевания является некротическое пожелтение жилок, распространяющееся на центральную жилку листа (рис. 3). В большинстве случаев типичные признаки на надземных частях растения отсутствуют, поэтому полевая диагностика по листьям затруднена [7,9].

Основным признаком ризомании является замедленный рост корнеплодов, масса корнеплода при этом может уменьшиться в 11-16 раз по сравнению со здоровыми. Наряду с ярко выраженной задержкой роста корнеплода по всей окружности его нижней части появляется отчетливая «бородатость», вызванная сильным образованием боковых корней. При поперечном разрезе корнеплода хорошо заметно побурение сосудистых пучков. При сильном развитии ризомании корнеплоды загнивают [7,10,13].



Рис. 3. Симптомы ризомании на корнеплодах и листьях

Все перечисленные признаки болезни встречаются на одном растении очень редко. Гибриды сахарной свеклы, устойчивые к ризомании, дают полную картину поражения только при высоком уровне инфекции. Обычно болезнь проявляется в центре поля и распространяется очагами по всей его площади [6,7].

Часто за ризоманию принимают ненормальное развитие корнеплода под воздействием неблагоприятных факторов произрастания, недостатка или избытка влаги, образования подошвы на глубине почвы 15-20 см и малой глубины пахотного слоя, а также в связи с поражением растения корнеедом, фузариозной гнилью или повреждением корнеплодов нематодами [7,11,13].

Главным резерваторм и переносчиком вируса ризомании является почвенный гриб – *Polymyxa betae* Keskin, семейства Plasmodiophoraceae. Распространяется гриб цистосорусами и зооспорами с двумя жгутиками, образует спорангии и покоящиеся споры (цисты), которые легко переносятся вместе с паводковой водой, растительными остатками, комочками почвы на сельскохозяйственных орудиях и транспорте, а также на корнеплодах свеклы.

Навоз также может играть роль в распространении болезни, так как споры гриба не теряют инфекционность после прохождения через желудочно-кишечный тракт животных. Отходы сахарного производства, включая жом, и вода, используемая для отмывки корнеплодов, также могут участвовать в распространении болезни. Споры гриба переносятся и ветром [6,13,14].

Вирус черного ожога свеклы (Beet black scorch virus). Впервые вирус был найден в северных провинциях Китая, где вызвал серьезные потери урожая.

При поражении сахарной свёклы вирусом чёрного ожога верхушка листьев отмирает, растения отстают в росте и выглядят карликовыми. Корни некротизируются, приобретая признаки, схожие с симптомами поражения вирусом ризомании.

Вирус инфицирует растения сахарной свеклы системно через корни зооспорами почвообитающего эндопаразитического гриба – *Olpidium brassicae* семейства Chytridiomycota.

Вирус черного ожога легко передается механической инокуляцией сока на растения *Chenopodium Amaranticolor*, *Chenopodium Guinoa*, *Spinacia oleracea*, *Tetragonia expansa*, на листьях которых через 3 дня после заражения образуются некротические пятна с хлоротичным окаймлением [10,11,16].

Почвенный вирус (Beet soil-borne virus). При поражении почвенным вирусом на листьях сахарной свёклы появляются некротические кольцевые пятна. У больных растений снижается фотосинтетическая активность листьев и как следствие уменьшается содержание сахара в корнеплодах, однако влияние вируса на урожайность сахарной свёклы практически отсутствует. Потери урожая увеличиваются при совместном поражении растений этим вирусом и вирусом ризомании [15,17].

Вирус чёрного ожога и почвенный вирус свеклы – заболевания мало изученные, имеют узкий ареал распространения. В условиях Республики Беларусь данные заболевания выявлены не были.

2. Методика обследования посевов сахарной свёклы, отбор проб и подготовка материала для проведения анализа.

Визуальный метод диагностики основан на выявлении специфических симптомов вирусного поражения растений. В некоторых случаях этот метод позволяет предварительно установить вид возбудителя болезни. Однако часто в агроценозах присутствует смешанная вирусная инфекция, что затрудняет их дифференциацию визуальным методом. Причём симптомы поражения часто зависят от растения-хозяина, штамма вируса, условий окружающей среды (температура воздуха и почвы, влагообеспечение, минеральное питание и др.). Иногда они схожи с признаками бактериальных, грибных и неинфекционных заболеваний (пятнистость и скручивание листьев, хлороз, увядание растений)

[6].

Поэтому диагностика вирусных болезней по внешним симптомам не позволяет надёжно установить этиологию вирусного заболевания. И всё же визуальный метод используется для ориентировочного определения заболеваний.

Обследованию в первую очередь подлежат посевы сахарной свёклы, расположенные в районах свеклосеяния с высокими температурами и большим количеством осадков на протяжении вегетации, на пойменных землях и почвах с близким залеганием грунтовых вод и тяжёлым механическим составом, а также в низменностях, где застаивается вода [6,10].

Для выявления вирусных заболеваний листового аппарата в различных эколого-географических зонах страны необходимо проводить обследования в период вегетации (фаза развития 4-5 пар листьев). Делается визуальный осмотр поля, и в зависимости от размера очага берётся от 1 до 4 проб, в каждой по 15-20 листьев с разных растений.

Из отобранных проб листьев свёклы необходимо получить сок для проведения анализа (рис. 4). Для этого используют вальцовый пресс, а при его отсутствии можно воспользоваться ступкой и пестиком. Полученный сок нужно профильтровать через несколько слоев марли и разлить по пронумерованным пробиркам.



Рис. 4. Получение сока из листьев на вальцовом прессе

Для выявления заболевания корнеплодов - ризомании после визуального осмотра формируют две пробы с поля по 5 корнеплодов с типичными признаками болезни. Корнеплоды выкапывают без удаления почвы с корешков. В случае выявления на листьях симптомов поражения ризоманией рекомендуется выкопка единичных наиболее типичных образцов для осмотра корнеплодов. Использование для анализа на ризоманию листьев не всегда дает точные результаты, поэтому лучше использовать корнеплоды.

Второе обследование необходимо провести в августе. У растений, поражённых в более поздние сроки в сухую, жаркую погоду во второй половине дня бывает снижен тургор листьев. Растения осматривают по двум диагоналям поля, прежде всего в местах обнаружения подозрительных на заболевание экземпляров. Отбор проб проводят в той же последовательности,

устанавливают число корнеплодов с симптомами поражения вирусом.

Основное обследование проводят во время уборки свёклы или во временных полевых кагатах. Из полевых буртов или кагатов по периметру без выбора отбирают не менее 5 проб в зависимости от объёма, в каждую пробу – по 5 корнеплодов с признаками ризомании [6].

Пробы корнеплодов сахарной свёклы необходимо хорошо промыть холодной водой для удаления излишков почвы и высушить на фильтровальной бумаге (рис.5). Для анализа отрезают 1/3 корнеплода с хвостовой части и получают из неё сок доступными способами.



Рис. 5. Промытые корнеплоды

Для проведения иммуноферментного анализа достаточно 1.5 мл сока с одной пробы.

3. Методика проведения иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из наиболее точных, высокочувствительных и специфичных методов лабораторного определения фитопатогенных вирусов. Особенно метод незаменим при диагностике вирусных заболеваний, где затруднены прямые методы обнаружения и идентификации возбудителя.

Метод основан на специфическом связывании антигенов и антител в пробе с дальнейшим выявлением их ферментной меткой. Для постановки ИФА используют поликлональные антитела, вырабатываемые в крови теплокровных животных (чаще кроликов) в ответ на введение определенного антигена. Среди различных вариантов ИФА (прямой, непрямой, конкурентный, «сэндвич» и др.) наибольшее распространение получил «сэндвич»-метод. Его проводят в три стадии инкубации с несколькими стадиями промывки. При постановке реакции используются планшеты из оптически прозрачного полистерола с 96 ячейками.

Главные участники реакции – антитела и антигены – прочно удерживаются на поверхности планшета благодаря силам адсорбции. Через определенное время, необходимое для адсорбции, ячейки промывают, после чего в них остаются только антитела. Затем в ячейки вносят исследуемые пробы, если вирус присутствует, то он реагирует со специфическими

антителами (рис. 6). В результате образуется иммунный комплекс антитело-антиген, который сохраняется в ячейках после очередной их промывки.

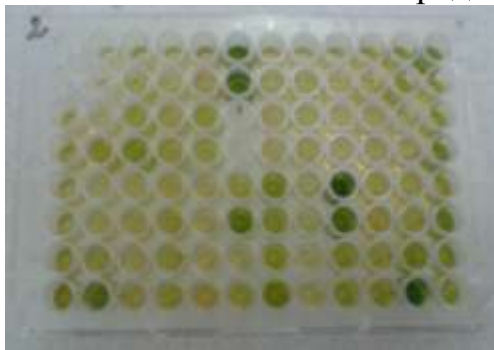


Рис. 6. Сок в ячейках планшета

Следующий этап – внесение в ячейки раствора с конъюгатами. Меченые ферментом (пероксидазой или щелочной фосфатазой) антитела находят «свои» антигены и соединяются с ними. Для обнаружения метки в ячейки добавляют субстрат-вещество, которое под действием фермента ускоренно окисляется. Раствор при этом окрашивается в желтый цвет. Так фермент сигнализирует о наличии вируса в пробе. Интенсивность окраски пропорциональна количеству вируса в ячейках (рис. 7).

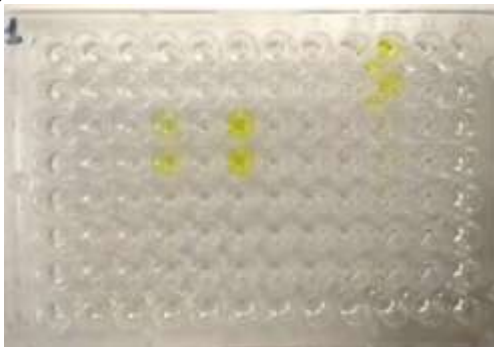


Рис. 7. Положительная реакция двух проб и контроля

Учет результатов осуществляют с помощью спектрофотометра с длиной световой волны 405 нм, измеряющего оптическую плотность продуктов ферментативной реакции непосредственно в ячейках планшета (рис.8) [10].



Рис. 8. Спектрофотометр

Для проведения ИФА на наличие возбудителей вирусных заболеваний на

сахарной свекле рекомендуется использование диагностических наборов фирм *Loewe Biochemica GmbH* и *Neogen Europe Ltd*.

Ущерб, наносимый вирусами, может быть значительно снижен при условии проведения ежегодного мониторинга вирусных заболеваний и их переносчиков с целью прогноза возможного появления эпифитотий и разработки научно и экономически обоснованных рекомендаций по мерам борьбы.

4. Рекомендации производству

Для снижения риска распространения вирусных заболеваний необходимо соблюдать следующие организационно-хозяйственные мероприятия:

- запрещение завоза семян и корнеплодов сахарной свеклы из зараженных территорий;
- рекомендуется не размещать посевы сахарной свеклы на пойменных землях и почвах с близким залеганием грунтовых вод и тяжёлым механическим составом, а также в низменностях, где застаивается вода;
- возделывание устойчивых к ризомании сортов и гибридов сахарной свеклы;
- пространственная изоляция посевов маточной сахарной свеклы от семенников на расстояние не менее 1000 м;
- сбалансированное минеральное питание повышает устойчивость растений сахарной свеклы;
- соблюдение севооборота для уменьшения инфекционной нагрузки на полях;
- посев сахарной свеклы в оптимально ранние сроки для того, чтобы к моменту заселения тлей растения приобрели фазовую устойчивость;
- формирование оптимальной густоты стояния растений сахарной свеклы, т.к. на изреженных посевах вредоносность тли увеличивается, следовательно, возрастает вероятность заражения растений вирусом;
- содержание посевов и прилегающих территорий в чистом от сорняков состоянии;
- систематическая борьба с насекомыми-переносчиками возбудителей вирусных заболеваний (тли, клопы, цикадки);
- минимизация потерь корнеплодов при уборке;
- снижение накопления инфекции в почве путем заделки растительных остатков на глубину 20-25 см;
- выращивание и использование на высадки корнеплодов только здоровой маточной свеклы.

5. Литература

1. Атлас. Вредители и болезни сахарной свеклы. / Делепланк – Мэзон-Лаффитт, 1993. – 165 с.
2. Болезни сельскохозяйственных культур: В 3 т. / под ред. В. Ф. Пересыпкина. – К.: Урожай, 1989. – Т. 2: Болезни технических культур и картофеля / В. Ф. Пересыпкин, Н. Н. Кирик, З. А. Пожар и др. – 248 с.
3. Вирусные болезни сельскохозяйственных растений и меры борьбы с ними. Труды V всесоюзного совещания по вирусным болезням растений / под ред. С. Н. Московец – Киев, 1966 г. – с. 311-316.
4. Дементьева М. И. Фитопатология. Изд. 2-е, перераб. и доп. М., «Колос», 1977 г. – 368 с. с ил.
5. Лялько И. М. Изучение вирусных болезней сахарной свеклы в процессе селекции на повышение устойчивости к заболеваниям. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / И. М. Лялько / Рамонь. 2001. -133 с.
6. Методические рекомендации по диагностике вирусного заболевания сахарной свеклы – ризомании (некротического пожелтения жилок) / Корниенко А.В., Стогниенко О.И., Сухоруких В.А. и др. – коллектив авторов – Рамонь-Москва, изд. «Истоки», 2008. – 46 с.
7. Пономарева В. С. Ризомания - потенциально опасное заболевание сахарной свеклы. // Защита и карантин растений. 2008. - №4. – с. 44-45.
8. Попова И.В. – Болезни сахарной свеклы. Под ред. Купцовой З. В. / Россельхозиздат, 1968. – 80 с.
9. Рязанцев Д.Ю. Диагностика ризомании сахарной свеклы / Живаева Т.С., Приходько Ю.Н., Завриев С. К. // Защита и карантин растений. 2012. - №8. – с. 29-31.
10. Сорока С.В. Вирусы и вирусные болезни сельскохозяйственных культур: монография / С.В.Сорока, Ж.В.Блоцкая, В.В. Вабищевич ; науч.ред. Р.В. Гнутова – Несвиж : Несвиж. укрупн. тип., 2009. – 128 с.
11. Шпаар Д. Симптомы «ризомании» сахарной свеклы могут вызываться вирусом черного ожога свеклы (Beet black scorch virus). – Вестник защиты растений: научно-теоретический журнал, под. ред. Павлюшина В. А. : Санкт-Петербург – Пушкин, 2008. С. 45-46.
12. Шпаар Д., Дрегер Д., Захаренко А. и др. Сахарная свекла (выращивание, уборка, хранение) / Под общей редакцией Д. Шпаара. – Мн.: ЧУП «Орех» 2004. – с. 326
13. Роїк М. В., А. К. Нурмухаммедов, А. С. Корниєнко / Хвороби коренеплодів цукрових буряків. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2004. – 224 с.: іл. – Бібліографія.: с. 188-223
14. Pavel Rysanek, Ihmed Homa : Study of sugar beet viruses transmitted by polomyxa betae in the Czech Republic – Zbornik Matice srpske za prirodne nauke / Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, № 110, 47—54, 2006
15. Prillwitz H.; Schlosser E. (1992) Beet soil-borne virus: occurrence, symptoms and effect on plant development. Mededelingen van de Faculteit

- Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 57.
16. Transmission of Beet black scorch virus by *Olpidium brassicae* / J. X. Jiang [et al.] // J. Jiangxi Agric. U. (Ch). – 1999. Vol. 21, 4. - P. 525-528.
 17. Tuitert G & Hofmeester. European Journal of Plant Pathology 100: 19, 1994.