

УДК 587.85/86:632.938:635.21

## ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИРУСОВ

В. А. ШМЫГЛЯ, О. И. НИКОЛАЕВА, Л. В. САЛЬСЕДО-КАРДЕНАС

(Кафедра фитопатологии)

Иммуноферментный анализ (ИФА) использовали для обнаружения вирусов в целях селекции и семеноводства картофеля и томата, а также в экспериментах с этими культурами. Показано, что ИФА можно применять для обнаружения вируса табачной мозаики (ВТМ) в семенах томата и табака, количественной оценки устойчивости томата к ВТМ. Культура картофеля *in vitro* может снижать результаты ИФА, иногда ниже порога положительных результатов. Декапитация растений, инкубация отделенных листьев, инокуляция ВТМ целых растений и отделенных листьев вызывают повышение значений ИФА и позволяют обнаруживать вирусные инфекции в ранее проверенных меристемных клонах картофеля. Обсуждаются вопросы интерпретации и достоверности результатов ИФА.

Иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) стал в последние годы одним из основных методов диагностики фитопатогенных вирусов в исследовательской работе и практике селекции, семеноводства и защиты растений. Первая публикация о применении ИФА для обнаружения вирусов растений [15] положила начало новому этапу в развитии практической диагностики этой группы патогенов. В обширной литературе, посвященной этому методу, речь идет преимущественно о его достоинствах, из которых обычно на первое место ставят высокую чувствительность и специфичность. При использовании ИФА можно

обнаружить вирусные антигены в концентрациях в сотни раз меньших, чем при капельном серологическом методе (КСМ). Этим в первую очередь объясняется более высокий, как правило, процент положительных результатов, получаемых данным методом иммунодиагностики [1, 2]. Высокая чувствительность ИФА сделала возможным обнаружение вирусов в клубнях картофеля [12], диагностику антигенов вируса скручивания листьев картофеля [13], количественное определение относительной устойчивости картофеля к вирусам [17].

Большинство данных, характеризующих чувствительность ИФА,

получено на очищенных препаратах вирусов или образцах сока искусственно зараженных восприимчивых растений. В то же время практическая диагностика имеет дело с различными путями заражения и различной устойчивостью растений, что весьма существенно влияет на развитие инфекционного процесса и особенности диагностики вирусов [8, 9]. Поэтому состоянию изученности ИФА с точки зрения объективных границ и условий достоверности результатов на различных объектах нельзя считать удовлетворительным.

ИФА широко применяется в нашей стране для проверки меристемных клонов картофеля и других культур на отсутствие вирусных инфекций [1, 7]. При этом распространено мнение о достаточной достоверности отрицательных результатов, получаемых с помощью этого метода, также основанное на лабораторных данных о его высокой чувствительности. Однако необходимо иметь в виду, что достоверность результатов диагностики далеко не всегда зависит от чувствительности применяемого метода [5, 8]. Кроме того, ИФА был разработан, как указывали его авторы, для обнаружения вирусов в растительных образцах, т. е. для получения положительных результатов при низких концентрациях антигенов. При проверке же любого растительного материала на отсутствие вирусов ставится существенно иная задача: получение достоверных отрицательных результатов. Достоверность отрицательных результатов ИФА требует особого внимания, так как она лежит в основе концепции «безвирусного» семеноводства картофеля и отбора устойчивых образцов в селекции.

В нашей лаборатории в 1983—

1990 гг. ИФА служил рабочим методом диагностики вирусов в экспериментах на картофеле и томате и одновременно — объектом изучения.

Испытание и применение ИФА для решения различных конкретных задач диагностики фитопатогенных вирусов позволило получить новые данные по ряду вопросов, в частности: показана возможность обнаружения вируса табачной мозаики (ВТМ) в семенах и сеянцах томата и табака [6], установлена передача ВТМ семенами томата и табака [8], обнаружено распространение ВТМ в растениях сверхчувствительных образцов табака [11], показана возможность количественной оценки устойчивости томата к ВТМ [10]. С помощью ИФА подтверждена ранее установленная передача мозаичных вирусов настоящими семенами картофеля. Но главное внимание уделялось применению ИФА для проверки и отбора здоровых меристемных клонов картофеля и определению достоверности отрицательных результатов этой проверки. С указанной целью испытывали влияние культуры *in vitro* инкубации отделенных органов растений и суперинфекции на результаты ИФА при диагностике мозаичных вирусов ХВК, СВК, ВВК, ФВК. ИФА проводили в варианте «двойного сэндвича» с использованием пероксидазных конъюгатов, изготовленных в НПО по картофелеводству МСХ РСФСР, при регистрации результатов на автоматическом ридере Dynatech MR-600.

#### Влияние культуры картофеля *in vitro* на результаты ИФА

Подопытный материал — растения сорта Невский с обычной зараженностью мозаичными вирусами,

выращенные в теплице. Фрагменты стеблей 4 растений, показавших положительные результаты КСМ и ИФА на ХВК, СВК, МВК и УВК, перевели в стерильную культуру на среде Мурасиге — Скуга. После трех пассажей черенкования *in vitro* по 2 растения каждого клона высадили в почву в теплице. ИФА, проведенный через 30 дней после высадки, дал результаты, существенно отличающиеся от исходных. После 12 пассажей повторили высадку в почву и провели ИФА 4 растений от каждого клона.

Данные табл. 1 показывают, что у большей части растений клонов, зараженных четырьмя мозаичными вирусами, получены отрицательные результаты ИФА, при этом у одного из четырех клонов они были установлены по четырем вирусам. Значения ИФА ниже порога положительных результатов сохранялись у высаженных в почву подопытных растений до конца вегетации. Таким образом, отрицательные результаты ИФА у зараженных растений картофеля в теплице могут быть следствием предшествующей культуры *in vitro*.

### Влияние инкубации отделенных частей растений картофеля на результаты ИФА при диагностике мозаичных вирусов

Известно, что отделение органов вегетирующих растений (листьев, верхушек стеблей, черенков) и поддержание их в течение некоторого времени в живом состоянии вызывает резкие изменения многих физиологических процессов [18]. Мы предложили, что при этом может происходить и активация вирусных инфекций, находившихся в интактных растениях в подавленном состоянии.

Для опыта взяли 10 растений клона № 3 из описанного выше опыта (немеристемный материал) и 54 растения 27 меристемных клонов сорта Невский, показавших отрицательные результаты ИФА по четырем мозаичным вирусам через 35 дней после высадки из пробирок в почву в теплице. От растений клона № 3 отделили по одному листу среднего яруса и инкубировали 10 дней во влажных камерах на свету, затем анализировали одновременно с исходными расте-

Таблица 1

Результаты ИФ-диагностики мозаичных вирусов картофеля сорта Невский после нескольких пассажей в стерильной культуре

Материал	Клон	Вирусы			
		ХВК	СВК	МВК	УВК
<i>Средние значения A<sub>490</sub> по 4 клонам</i>					
Исходные растения	—	0,782	0,265	0,282	0,049
После 3 пассажей	—	0,406	0,024	0,094	0,161
» 12 »	—	0,098	0,030	0,047	0,048
Порог положительных результатов (P)	—	0,120	0,145	0,133	0,062
<i>Бинарные результаты по клонам после 12 пассажей</i>					
	1	+	—	—	—
	2	+	—	—	—
	3	—	—	—	—
	4	+	+	—	+

ниями (контроль). От 27 растений меристемных клонов отделили (стерильным инструментом) верхушки стеблей длиной 5—6 см и выдерживали в стаканчиках с водопроводной водой в тех же условиях, что и контрольные (интактные) растения тех же клонов. Верхушки и контрольные растения анализировали одновременно. Все контрольные и исходные растения показали отрицательные результаты.

Порог положительных результатов определяли на основании дисперсионного анализа количественных данных по формуле  $P = \bar{X}_0 + \text{НСР}_{05}$ , где  $\bar{X}_0$  — среднее значение оптической абсорбции в контроле,  $\text{НСР}_{05}$  — наименьшая существенная разность по вариантам опыта.

Таблица 2  
Результаты ИФ-диагностики мозаичных вирусов в растениях картофеля сорта Невский при инкубации отделенных листьев и верхушек стеблей

Вариант	Количество образцов	Образцы с положительными результатами, %
<i>Клон № 3 (немеристемный)</i>		
Исходные растения (контроль)	10	0
Отделенные листья	20	40
<i>Меристемные клоны</i>		
Интактные растения	27	0
Отделенные верхушки	27	47,4

Из табл. 2 следует, что инкубация отделенных листьев и верхушек стеблей позволяет получить значительный процент положительных результатов в тех случаях, когда обычная методика ИФА дает отрицательные результаты. Вероятно, это объясняется тем, что физиологический стресс при отделении от растений их частей вызывает в по-

следних активацию ингибированных вирусных инфекций и накопление вирусных антигенов в концентрациях, обнаруживаемых с помощью ИФА. Однако нет оснований считать, что зараженность материала при этом обнаруживается полностью.

25

### Влияние инфицирования растений и их частей ВТМ на результаты ИФА при диагностике мозаичных вирусов картофеля

Известно, что растения культурных сортов картофеля реагируют на инокуляцию ВТМ образованием местных некрозов с последующей системной инфекцией, часто с тяжелыми симптомами [3]. Поэтому инфицирование ВТМ может рассматриваться как стрессовое воздействие на растение, способное, вероятно, изменить его взаимоотношения с другими вирусами, присутствующими в этом растении. Исписано явление синергизма вирусов, т. е. взаимного стимулирования их накопления и усиления патогенности в одном растении [5]. Мы предположили, что инокуляция растений меристемных клонов картофеля ВТМ будет способствовать выявлению их ингибированной зараженности мозаичными вирусами.

Растения меристемных клонов сортов Невский, Лорх, Бирюза, Пригожий 2, высаженные из пробирок в теплице, проанализировали методом ИФА на ХВК, СВК, МВК и УВК и во всех случаях получили отрицательные результаты.

Опыт 1. Варианты внутри каждого клона: интактные растения (контроль), инокуляция ВТМ целых растений, инокуляция ВТМ отделенных листьев с последующей их инкубацией во влажных камерах. ИФА во всех вариантах проводили одновременно: целых расте-

ний — через 30 дней, отделенных листьев — через 12 дней после инокуляции.

**Опыт 2.** От растений меристемных клонов отделили по 2 листа среднего яруса. Один лист инокулировали ВТМ, затем оба листа с номером исходного растения инкубировали во влажных камерах на свету в течение 12 дней. Результаты ИФА в обоих опытах представлены в табл. 3.

Как и в предшествующих опытах, инкубация отделенных листьев вызвала появление положительных результатов ИФА. Однако в варианте с инокуляцией ВТМ отделенных листьев разница в сравнении с контролем по значениям экстинкции и проценту образцов, показавших положительные результаты, оказалась значительно больше. Высокий процент положительных результатов отмечен и при инокуляции ВТМ целых растений. Все контрольные растения тех же клонов дали отрицательные результаты.

Приведенные данные свидетель-

ствуют о том, что меристемные клоны, дававшие после неоднократной проверки отрицательные результаты при использовании обычной методики ИФА (т. е. без специальной подготовки проверяемых образцов), в опытах показали высокий процент зараженности мозаичными вирусами. При этом имеют основания полагать, что обнаружена не вся зараженность, поскольку повторная проверка клонов с отрицательными результатами при первой проверке снова выявила высокие проценты положительных результатов. В некоторых случаях в итоге двух или трех проверок по описанной выше методике получали 100 % положительных результатов, по крайней мере по одному вирусу. Это наводит на мысль о том, что в меристемном материале вообще нет безвирусных клонов, а мнение об элиминировании вирусов в культуре апексов возникло вследствие обратимого подавления репродукции вирусов в них и в последующей культуре эксплантатов и регенерантов.

Таблица 3

Результаты ИФ-диагностики мозаичных вирусов в меристемных кломах картофеля при инокуляции ВТМ растений и отдельных листьев

Вариант	Количество образцов	Из них показали положительные результаты				В % к контролю	
		всего, шт.	в т. ч. по вирусам, шт.				
			ХВК	СВК	МВК		УВК
<i>Невский, Лорх, Бирюза, Пригожий 2</i>							
Интактные растения (контроль)	30	0	0	0	0	0	
Инокуляция ВТМ целых растений	30	14	13	8	10	8	46,6
<i>Невский</i>							
Исходные растения (контроль)	83	0	0	0	0	0	0
Инкубация отделенных листьев	83	12	4	2	2	12	14,4
Инокуляция отделенных листьев ВТМ	83	32	12	12	14	25	38,3

## Интерпретация количественных результатов ИФА

Количественные результаты ИФА — показатели оптической абсорбции (экстинкции) — находятся в нелинейной положительной зависимости от концентрации гомологичных вирусных антигенов в образце. При этом на значения фоновых и рабочих показателей оказывает влияние ряд случайных факторов: биохимический состав образцов, неоднородности материала палеты, погрешности в дозировке реагентов и др. Этих ошибок полностью избежать нельзя, однако необходимо стремиться к тому, чтобы они не оказывали существенного влияния на окончательную оценку итогов анализа. Метод интерпретации результатов зависит от конкретной задачи работы: а) оценки относительной устойчивости сорта или селекционного образца при искусственной инокуляции растений; б) обнаружения присутствия вирусов в образцах; в) установления отсутствия вирусов в образцах. Очевидно, в первом случае не требуется деления результатов на положительные и отрицательные, количественные данные могут быть обработаны непосредственно с помощью обычных методик статистической обработки для устранения случайной дисперсии. Обязательное условие сопоставимости данных в этом случае — сравнение образцов в одной серии анализов, причем в одной палете должны быть представлены все испытываемые образцы. В остальных двух случаях необходимо определение порога положительных результатов (ППР, P).

Известны, по крайней мере, три методики его определения [2, 4, 14]. При анализе на положительный результат могут быть использованы все три. Например, если требуется

выделить достоверно зараженные образцы, то условный ППР определяется по формуле  $P = X + 3E$ , где  $X$  — среднее в отрицательном контроле,  $3E$  — тройное отклонение от среднего, при этом отрицательным контролем может служить группа образцов той же серии, показавших наименьшие значения экстинкции. В итоге достигается достаточно высокая достоверность положительных результатов.

Эта методика оказалась совершенно непригодной при проверке материала на отсутствие вирусных инфекций. Здесь высокие требования предъявляются к отрицательному контролю, так как случайные колебания среднего могут вызвать резкие изменения в соотношении положительных и отрицательных результатов. Существующие методики предписывают использовать в качестве отрицательного контроля образцы, однородные с испытуемыми, но заведомо не содержащие диагностируемых вирусов. Такое требование в практической диагностике невыполнимо, поскольку отсутствие вирусов, в частности у картофеля, нельзя констатировать с полной уверенностью. Поэтому часто используют образцы другого вида, невосприимчивого к диагностируемому вирусам. Наш опыт показывает, что в зависимости от выбора (иногда случайного) отрицательного контроля значения ППР могут различаться в 2—3 раза и более. Понятно, что полученные таким образом бинарные результаты не могут быть ни объективными, ни сопоставимыми.

Мы пришли к выводу, что объективным критерием оценки результатов ИФА при проверке на отсутствие вирусных инфекций может быть существование различий средних значений экстинкции при анализе сока интактных растений

и растений того же клона или сортообразца, подвергавшихся воздействию вирусстимулирующих факторов, подобных описанным выше. Существенное (статистически достоверное) различие между этими значениями означает наличие в образце (клоне) диагностируемого вируса. Отсутствие существенного различия — условно отрицательный результат, но не доказательство отсутствия вируса в образце, поскольку такой результат может быть обусловлен обратимым подавлением вируса в растении.

Обсуждение наших экспериментальных данных с учетом литературных сведений дает основания для следующих выводов.

1. Отрицательные результаты ИФА, полученные при проверке меристемных клонов картофеля, не могут служить основанием для утверждения о «безвирусности» растений и клонов.

2. Процент положительных результатов ИФА при анализе меристемных растений картофеля на зараженность мозаичными вирусами может быть существенно повышен воздействием на испытуемый материал стрессовых факторов: отделения листьев с последующей инкубацией их на свету, инокуляции ВТМ целых растений и отделенных листьев.

3. Критерием для разделения результатов ИФА на положительные и условно отрицательные может служить существенность различий средних значений экстинкции между вариантами с применением вирусстимулирующих воздействий и интактным контролем внутри одного клона (сортообразца).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Атабеков И. Г. Иммунодиагностика вирусов растений — резервные миллиарды в сельском хозяйстве.— Биотехнология. М.: Наука, 1984, с. 234—238.— 2. Бобкова А. Ф., Чирков С. Н. Применение

иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний растений (обзор).— С.-х. биология, 1983, № 5, с. 32—36.— 3. Ларина Э. И. Вирус табачной мозаики на картофеле.— В кн.: Вирусные болезни с.-х. растений и меры борьбы с ними. Л.: Наука, 1978, с. 35—36.— 4. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля.— М.: Изд-во МГУ, 1985.— 5. Мэтьюс Р. Вирусы растений / Пер. с англ.— М.: Мир, 1973.— 6. Николаева О. И., Актаа С., Шмыгля В. А. Иммуноферментная диагностика семенной инфекции вируса табачной мозаики у томата и табака.— Изв. ТСХА, 1986, вып. 1, с. 134—137.— 7. Трофимец Л. Н. Развитие биотехнологии в картофелеводстве.— В сб.: Селекция и семеноводство картофеля. Науч. тр. НИИКХ, 1989, с. 100—105.— 8. Шмыгля В. А., Макаев С. Ш., Актаа С. Особенности диагностики вируса табачной мозаики при передаче его семенами томата и табака.— С.-х. биология, 1985, № 2, с. 96—102.— 9. Шмыгля В. А., Макаев С. Ш., Актаа С., Николаева О. И. О типах инфекционного процесса и свойствах вируса табачной мозаики.— С.-х. биология, 1985, № 11, с. 43—46.— 10. Шмыгля В. А., Осман А. Применение иммуноферментного анализа в селекции томата на устойчивость к вирусу табачной мозаики.— Докл. ВАСХНИЛ, 1990, № 8, с. 23—27.— 11. Шмыгля В. А., Юнис С., Большакова Л. В. О природе устойчивости к вирусу табачной мозаики видов и сортов табака — носителей гена N. Биол. науки, 1989, № 10, с. 32—36.— 12. Bokx J. A., Piron P. G. M., Maat D. Z.— Potato Res., 1980, vol. 23, p. 129—131.— 13. Casper R.— Phytopath. Z., 1977, vol. 90, p. 364—368.— 14. Casper R., Meyer S.— Nachrbl. Dtsche Pflanzenschutzdiens, 1981, Bd 33, S. 49—54.— 15. Clark M. F., Adams A. N.— J. gen. Virology, 1977, vol. 34, p. 475—483.— 16. Hunnius W., Daniel G.— Gesunde Pflanzen, 1979, Bd 31, S. 287—290.— 17. Schenk G., Kalinina I., Kegler H., Richter J.— Recent Results in Plant Virology. Summaries of the Symposium. Reinhardtsbrunn, 1986, S. 93.— 18. Street H. E. (Ed.) Plant Tissue and Cell Culture. L., 1977.

Статья поступила 4 февраля 1991 г.