

УДК 635.63:632.38

КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ У ТОМАТА

В.А. ШМЫГЛЯ, Р. БАНДУЛА

(Кафедра фитопатологии)

Сравнивали накопление вируса табачной мозаики (ВТМ) в целых растениях и укорененных листьях устойчивых к ВТМ гибридов и восприимчивых сортов томата. Методы диагностики ВТМ: количественный иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA), индикаторная диагностика на листьях табака Ксанти некротикум, капельная серодиагностика.

Сделан вывод о том, что в целых растениях устойчивых гибридов при механической инокуляции и в растениях восприимчивых сортов при семенной инфекции ВТМ развивается ингибированный инфекционный процесс. В изолированных укорененных листьях этот процесс переходит в обычный с накоплением вирусного антигена и инфекционных частиц.

Инфекционный процесс, возникающий при контактно-механическом заражении вирусом табачной мозаики (ВТМ) у системно восприимчивых к нему растений, изучен сравнительно подробно [16, 17]. При благоприятных температуре и освещенности неинфекционная лаг-фаза этого процесса продолжается

не более суток, затем быстро развивается системная инфекция с накоплением целых вирусных частиц во всех частях инфицированного растения.

У томата существует и другой тип инфекционного процесса ВТМ, при котором образование и накопление целых частиц вируса обратимо пода-

Методика

влено, вирусный антиген накапливается в очень низкой концентрации, инфекционность в соке отсутствует или очень слаба [6, 7]. Описанный тип инфекционного процесса ВТМ обнаружен нами при передаче ВТМ семенами томата [1, 8], прямом инфицировании растений томата, относительно устойчивых к ВТМ [12], а также при корневой инфекции [5]. Во всех указанных случаях ВТМ может быть обнаружен в листьях с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), методом «посредника» [9], но другие методы, в частности индикаторная диагностика, дают отрицательные результаты, поэтому передача ВТМ семенами томата и типы устойчивости томата к этому вирусу до сих пор остаются в числе спорных вопросов [3, 4].

Приведенные выше примеры показывают, что существует теоретический интерес и практическая целесообразность дальнейшей разработки методов обнаружения ВТМ, находящегося в ингибированном состоянии в растительных образцах, путем направленного изменения типа инфекционного процесса, стимулирования образования и накопления целых вирусных частиц. Наши предшествующие исследования показали, что этого можно достичь в результате различных стрессовых воздействий, в частности — инкубации отделенных органов растений [10]. Мы предположили, что культура изолированных листьев от растений томата, содержащих ВТМ в ингибированном состоянии, может вызвать быстрое накопление инфекционного и антигенно-активного вируса и позволит обнаруживать его простыми методами.

Растения томата устойчивых к ВТМ гибридов F_1 Карлсон ($Tm - 2^2/Tm - 2^2$) и Верлиока ($Tm - 2^2/+$, $Tm - 1/+$) и восприимчивых к ВТМ сортов Волгоградский 5/95 и Невский 7, выращенных из семян, зараженных этим вирусом, в грунтовой теплице, использовали в опытах в возрасте 4—6 настоящих листьев.

Варианты опыта с гибридами: 1 — контроль, интактные растения; 2 — механическая инокуляция ВТМ целых растений (по 2 листа среднего яруса); 3 — отделение и укоренение неинокулированных листьев от инокулированных растений; 4 — отделение и укоренение инокулированных листьев; 5 — инокуляция ВТМ укорененных листьев.

Варианты опыта с растениями восприимчивых сортов: 1 — контроль, интактные растения; 2 — укоренение отделенных листьев; 3 — укоренение верхушек побегов длиной около 5 см.

Через 30 дней после начала опыта сок листьев и целых растений всех вариантов анализировали на ВТМ тремя методами: капельной серодиагностики [2], количественного ИФА [14] и инокуляции листьев растения-индикатора — табака сорта Ксанти некротикум [15, 16].

Результаты и их обсуждение

Инокуляция ВТМ целых растений гибридов Карлсон и Верлиока вызвала небольшое повышение средних значений оптической абсорбции по сравнению с интактным контролем (рис. 1). Эти данные подтвердили ранее полученные нами

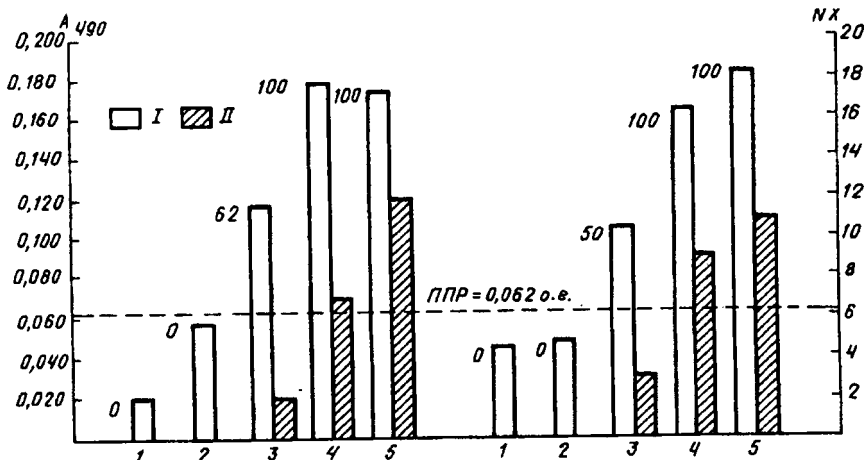


Рис. 1. Результаты диагностики ВТМ в целых растениях и укорененных листьях устойчивых F_1 гибридов томата Верлиока (слева) и Карлсон. 1-5 - варианты опыта; I - результаты ИФА - A_{490} - значения оптической абсорбции при длине волны 490 нм в оптических единицах (о.е.), ППР - порог положительных результатов ИФА; II - результаты инокуляции листьев табака сорта Ксанти - NX - среднее количество некрозов на 1 лист табака; 0 - 100 % - результаты капельной серодиагностики.

данные о развитии ингибированной репродукции ВТМ в образцах томата с генотипом устойчивости к этому вирусу [12]. Анализ сока укорененных изолированных листьев с инокуляцией ВТМ до или после отделения показал во всех случаях положительные результаты ИФА и капельной серодиагностики, инфекционность на листьях табака Ксанти. Эти данные свидетельствуют о том, что в изолированных укорененных листьях устойчивых к ВТМ гибридов томата процесс репродукции вируса идет по обычному типу, с образованием и накоплением целых вирусных частиц. Следовательно, устойчивость томата к ВТМ, определяемая генами $Tm - 2$ и $Tm - 2^2$, проявляется в подавлении образования целых вирусных

частиц только на уровне целого растения.

В опыте с сортами томатов Волгоградский 5/95 и Невский 7, выращенных из зараженных ВТМ семян, у целых растений значения ИФА были ниже порога положительных результатов (ППР), отмечены единичные некрозы на листьях Ксанти и получены отрицательные результаты капельной серодиагностики (рис. 2). Укорененные листья от растений той же партии дали положительные результаты ИФА, высокую инфекционность сока и положительные результаты капельной серодиагностики. Эти данные подтверждают ранее сделанные нами выводы о том, что в растениях томата, развившихся из зараженных ВТМ семян, вирус на-

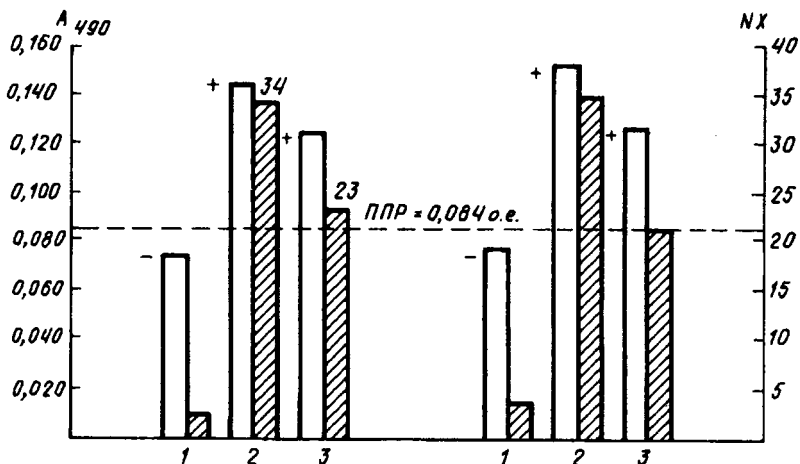


Рис. 2. Результаты диагностики ВТМ в целых растениях, укорененных листьях и верхушках побегов растений восприимчивых сортов томата Волгоградский 5/95 (слева) и Невский 7, выращенных из зараженных ВТМ семян.

1-3 - варианты; (+) или (-) - результаты капельной серодиагностики. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ходится в ингибированном состоянии. В укорененных листьях от этих растений ингибирование не проявляется и вирус накапливается, судя по высокой инфекционности в соке, в форме целых вирусных частиц.

К числу вероятных причин наблюдаемого явления мы относим травматический шок при отделении листьев от растений, а также глубокую перестройку физиологических процессов в укорененных листьях. Одно из главных их отличий от целых растений — отсутствие ростовых и формообразовательных процессов вследствие отсутствия точек роста.

Сопоставив результаты диагностики ВТМ у гибридов томата, относительно устойчивых к этому виру-

су, и растений восприимчивых сортов, выращенных из зараженных ВТМ семян, можно отметить, что состояние вируса в исходных растениях и изменения этого состояния в изолированных укорененных листьях в обоих видах материала сходны.

Для ингибированного состояния характерно торможение или блокировка образования вирусных частиц в течение длительного времени, иногда в течение всей вегетации. Это состояние обратимо и может быть снято различными стрессовыми воздействиями, в частности нарушением целостности растительного организма и глубокой перестройкой физиологических процессов в изолированных органах. Переход ингибированного инфекцион-

ного процесса ВТМ в обычный дает возможность обнаружить вирус в растениях независимо от его первоначального состояния. По нашему мнению, это имеет значение, во-первых, при решении некоторых вопросов биологии фитопатогенных вирусов, в частности передачи их семенами; во-вторых, для выявления истинной зараженности растительного материала и причин эпифитотий в практике защиты растений от вирусных болезней. И, наконец, использование изолированных укорененных листьев в селекции томата дает возможность количественно оценить относительную устойчивость селекционных образцов томата к ВТМ с меньшими затратами труда, времени и тепличной площади, чем при существующей методике. Показателями для такой оценки могут быть количественные результаты ИФА в изолированных листьях.

По нашим данным, незавершенная репродукция вирусов широко распространена также у картофеля. Ингибированный процесс репродукции мозаичных вирусов обнаружены нами в сеянцах [11, 13] и растениях меристемных клонов картофеля [10, 11]. В обоих случаях вирусные антигены выявляли методом ИФА при отсутствии инфекционности в соке, но последняя появлялась и быстро возрастала после стрессовых воздействий — декапитации растений и инкубации отделенных листьев во влажных камерах на свету.

Весьма вероятно, что описанные закономерности действуют не только в пределах одного ботанического семейства пасленовые, а свойственны и другим сочетаниям растение — вирус. Во всяком случае, имеющи-

еся сведения по обсуждаемой проблеме указывают на необходимость дальнейших исследований в этом направлении на более широком материале.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Актаа С.* Диагностика семенной инфекции вируса табачной мозаики у томата и табака. — Автореф. канд. дис. М.: ТСХА, 1986. — 2. *Дунин М.С., Кувшинова Е.В.* Капельный метод серодиагностики вирусных и бактериальных болезней растений. — Уч.-метод. пособие. М.: ТСХА, 1958. — 3. *Кеглер Х., Кляйнхемпель Х.* Устойчивость томатов. — В кн.: Борьба с вирусными болезнями растений/Под ред. Д. Шпаар, Х. Кляйнхемпель. М.: Агропромиздат, 1986, с. 263—267. — 4. *Кляйнхемпель Х.* Передача вирусов от растения к растению. — В кн.: Борьба с вирусными болезнями растений/Под ред. Д. Шпаар, Х. Кляйнхемпель. М.: Агропромиздат, 1986, с. 55—75. — 5. *Шмыгля В.А.* О корневой вирусной инфекции томатов и картофеля. — Докл. ТСХА, 1963, вып. 89, с. 393—398. — 6. *Шмыгля В.А.* Типы инфекционного процесса вируса табачной мозаики и диагностика зараженности растительного материала. — Биол. науки, 1987, № 6, с. 22—28. — 7. *Шмыгля В.А.* О формах существования вирусов растений. — Вестн. с.-х. науки, 1985, № 2, с. 100—103. — 8. *Шмыгля В.А., Макаев С.Ш., Актаа С.* Особенности диагностики вируса табачной мозаики при передаче его семенами томатов и табака. — С.-х. биол., 1984, № 11, с. 60—62. — 9. *Шмыгля В.А., Макаев С.Ш., Юнис С.* Метод «посредника» в ди-

агностике вирусов растений.— С.-х. биол., 1991, № 5, с. 190—193.— 10. Шмыгля В.А., Николаева О.И., Большакова Л.В. Достоверность иммуноферментной диагностики вирусов растений и пути ее повышения.— Тр. I Всесоюз. совещ. по биотехнологии в АПК. М., 1986, с. 109—113.— 11. Шмыгля В.А., Николаева О.И., Сальседо-Карденас Л.В. Иммуноферментная диагностика фитопатогенных вирусов.— Изв. ТСХА, 1991, вып. 4, с. 68—74.— 12. Шмыгля В.А., Осман А. Применение иммуноферментного анализа в селекции томата на устойчивость к ВТМ.— Докл. ВАСХНИЛ, 1990, № 8, с. 23—27.—

13. Шмыгля В.А., Русинова Е.Я. О передаче вируса М семенами картофеля.— В кн.: Селекция и семеноводство картофеля. Научн. тр. НИИКХ, 1973, вып. 14, с. 117—119.— 14. Clark M.F., Adams A.N.— J. Gen. Virology, 1977, vol. 2, p. 475—483.— 15. Hill S.A. Methods in plant pathology. Palo Alto, 1984.— 16. Kado C.J., Agrawal H.O. Principles and techniques in plant virology. N.Y., 1972.— 17. Sulzinsky M.A., Zaitlin M.— Virology, 1982, vol. 121, № 1, p. 12—19.— 18. Zaitlin M. Replication of plant viruses: an overview.— In: Beltsville Symposium in Agric. Research. Montclair, 1977, p. 33—46.

*Статья поступила 1 февраля
1994 г.*

SUMMARY

Accumulation of tobacco mosaic virus (TMV) in whole plants and rooted leaves of TMV-resistant and susceptible varieties has been studied. Such methods of TMV detection as quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), inoculation of tobacco leaves (cv. Xanthi necroticum) and drop agglutination were used. Accumulation of the virus in the form of infective particles has been detected in the leaves of resistant hybrids F_1 Verlyoka and Carlson rooted either before or after mechanical inoculation, but not in whole plants. Ordinary TMV infection process has been detected in rooted leaves from plants of two susceptible cultivars infected by TMV through seed.

The conclusion was made that in whole plants of resistant hybrids with mechanical inoculation and in plants of susceptible cultivars with seed infection an inhibited TMV infection process develops. In rooted leaves this process becomes an ordinary one with accumulation of the virus in the form of infective particles.