

УДК 632.3.07:635.48:634.64

ИММУНОФЕРМЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА СЕМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ ВИРУСА ТАБАЧНОЙ МОЗАИКИ У ТОМАТА И ТАБАКА

О. И. НИКОЛАЕВА, С. АКТАА, В. А. ШМЫГЛЯ
(Кафедра фитопатологии)

Необходимым условием надежности диагностики фитопатогенных вирусов является использование достоверных методов, обладающих высокой чувствительностью и способностью выявить вирусы в любой форме. При контактно-механической передаче в системно восприимчивых растениях происходит быстрое накопление вирусов до высокой концентрации. Обнаружить их сравнительно легко известными методами, например при помощи капельной серодиагностики. Значительно сложнее обстоит дело с диагностикой семенной инфекции. Семена и проростки многих растений содержат ингибиторы вирусов [9, 18], подавляющие их репродукцию, вследствие чего диагностика зараженности затруднена. Типичным примером является семенная инфекция вируса табачной мозаики (ВТМ). Факт передачи ВТМ семенами томата установлен давно и позже неоднократно подтверждался [2, 8]. Однако проростки, развившиеся из зараженных семян, дают, как правило, отрицательные результаты при серологической (капельной) диагностике и на индикаторах с местной некротической реакцией [6, 7]. В то же время прививка проростков из зараженных семян на молодые растения турецкого табака *Nicotiana tabacum* L., инокуляция семядолей огурца по Холмсу [11] с окрашиванием их йодом или последующим пассажем суспензии из семядолей огурца на листья *Nicotiana glutinosa* L. дают до 100 % положительных результатов [6]. Методом инокуляции ВТМ семядольных листьев огурца вирус был обнаружен и в зрелых семенах, и проростках турецкого табака, что опровергает распространенное мнение о том, что вирус не передается семенами табака [4]. Однако обе указанные методики малопригодны для широкого практического использования, так как довольно трудоемки и требуют изолированных помещений с регулируемым режимом. Это, а также неоднозначность мнений о семенной передаче ВТМ свидетельствуют о необходимости поиска и испытания чувствительных и достоверных методов выявления семенной вирусной инфекции, перспективных для применения в селекции и семеноводстве.

В последние годы все шире применяется иммуноферментный метод диагностики вирусов (ИФА), превосходящий по чувствительности индикаторный метод [3, 12, 16 и др.]. ИФА в настоящее время успешно используется для диагностики вирусов в семенах различных культур, в частности тыквы, сои, салата [13, 14, 17]. В литературе пока отсутствуют сообщения о применении ИФА для обнаружения семенной инфекции ВТМ.

Нами проведено испытание ИФА для диагностики семенной инфекции ВТМ у томата и турецкого табака *N. tabacum* L. В целях сопоставления полученных результатов параллельно проводили диагностику тех же партий семян, проростков и растений томата и табака, полученных от зараженных растений, методом инокуляции отделенных листьев *N. glutinosa* и двухфазной инокуляцией *N. tabacum*—*N. glutinosa*.

Материал и методы

Работу проводили с семенами, проростками и взрослыми растениями томата (сорт Пионерский) и табака *N. tabacum* L. (сорт Самсун), полученными от растений, зараженных обычным штаммом ВТМ.

Анализировали гомогенаты проб семян, проростков и листовой ткани в 0,01-молярном фосфатном буфере (рН 7,4) с 0,9 % хлористого натрия. Диагностикумы (γ -глобулины и конъюгат) для ИФА на ВТМ были подготовлены по следующим методикам. ВТМ накапливали в растениях табака в условиях изоляции. После гомогенизации и осветления экстракта хлороформом препарат концентрировали методом изoeлектрической преципитации и далее очищали 3-кратным дифференциальным центрифугированием [1], затем материал центрифугировали при ступенчатом градиенте плотности хлористого цезия [5]. Чистоту и концентрацию препарата определяли спектрофотометрическим методом, коэффициент экстинкции ($E_{260}:E_{280}$) составил 1,27. Анти-сыворотку к ВТМ получали методом предварительной иммунизации кроликов. Дважды с интервалом 3 нед вводили 1 мг антигена с адъювантом Фройнда подкожно, обкалывая шею кролика в 5—6 точках, затем через 10 дней — 2 раза внутривенно по

3 мг антигена с интервалом 3 дня. Кровь брали на 10-й день после последней иммунизации. Титр сыворотки, определенный капельным методом, составил 1:2048 по препарату, неспецифических реакций с нормальными белками растения не отмечено. Осаждали иммуноглобулины сыворотки насыщенным раствором сульфата аммония, конъюгат получали по общепринятой методике периодатным способом [15]. Анализ проводили по [10] в «сэндвич»-варианте. Полистироловые платы сенсibilизировали глобулинами в концентрации 10 μ /мл. Количественные результаты ИФА — показатели оптической абсорбции E_{490} — получали на автоматическом ридере MR-600 фирмы Dupatech. Материал для биологического тестирования готовили следующим образом. Пробы семян 0,1 г, проростков (10 шт.) и листового материала (0,1 г) растирали отдельно в ступках с 1 мл дистиллированной воды. Полученными гомогенатами путем натирания инокулировали отделенные листья дикого клейкого табака *N. glutinosa* и табака турецкого *N. tabacum* с последующим пассажем на *N. glutinosa* суспензии инокулированных листьев после их инкубации в течение 10—12 дней во влажной камере на свету (двухфазная инокуляция).

Обсуждение

Результаты диагностики ВТМ в семенах, проростках и растениях томата и табака, полученных от зараженных и здоровых растений, приведены в таблице. Следует отметить, что все варианты, кроме взрослых растений табака и томата, системно зараженные ВТМ контактным путем (положительный контроль, не приведенный в таблице), при капельной серодиагностике дали отрицательный результат.

Значения E_{490} для семян, проростков из семян от здоровых растений томата и взрослых растений томата из здоровых семян составляют 0,09—0,18 о. е. Их с большой достоверностью можно принять за фон сыворотки. Считали здоровыми и те же варианты *N. tabacum*, а также устойчивые к ВТМ гибрид Терновского и Xanthi, однако фон здесь несколько выше (0,16—0,29 о. е.). По-видимому, сказалось то, что для получения сыворотки использовали в качестве накопителей растений *N. tabacum*. Фоновые значения абсорбции были определены для каждой группы исследуемого материала отдельно: семена томата — 0,12 о. е., проростки томата — 0,14, взрослые растения томата — 0,18, семена табака — 0,19, проростки табака — 0,29, взрослые растения табака — 0,29 о. е. При $E_{490} \geq x + 3E$, где x — среднее значение E_{490} в здоровом контроле, E — максимальное отклонение, мы считали, что получен по-

Результаты диагностики ВТМ в семенах, проростках и взрослых растениях томата и табака при n = 93 (хранение семян 10 мес)

Материал	ИФА, среднее значение E ₄₉₀ , о. е.		Биотест, среднее количество некрозов на 1 инок. лист (семена от зараженных растений)	
	семена от зараженных растений	семена от здоровых растений	N. glutinosa	двухфазная инокуляция N. tabacum—N. glutinosa

Томат сорт Пионерский

Сухие необработанные семена	0,45±0,10	0,10±0,02	11	—
Семена, обработанные 20%НСI	0,32±0,05	—	2	—
Проростки в фазе семядольных листьев	0,32±0,09	0,12±0,03	0	0
Растения в фазе цветения первой кисти	0,49±0,10	0,13±0,04	0	0

Табак N. tabacum, сорт Самсун

Сухие семена	0,47±0,07	0,17±0,01	2	—
Проростки	0,37±0,09	0,22±0,07	0	0
Взрослые растения	0,47±0,12	0,26±0,02	0	0
Молодые растения Xanthi		0,21±0,03	—	—
Взрослые растения гибрида Терновского		0,20±0,07	—	—

Примечание. — анализ не проводился.

ложительный результат.

Взрослые растения табака и томата, системно зараженные ВТМ контактным путем, давали очень высокие значения E₄₉₀, часто за пределами шкалы прибора. Эти растения с характерными внешними признаками заболевания приняты нами в качестве положительного контроля. Результаты ИФА проростков и растений из зараженных ВТМ семян показывают, что все они содержат вирусный антиген в низких концентрациях, недоступных для определения капельным методом диагностики.

Параллельная проверка тех же образцов семян на отделенных листьях N. glutinosa дала единичные некрозы на части инокулированных листьев, т. е. концентрация инфекционных частиц была на пределе чувствительности этого индикатора. При диагностике проростков и растений в фазе цветения первой кисти двумя применяемыми нами биотестами не получено положительных результатов.

Выводы

1. Иммуноферментный метод может быть использован для определения зараженности партий семян томата и табака ВТМ.
2. Семенами томата и турецкого табака ВТМ передается практически в 100 % случаев.
3. Чувствительность ИФА при обнаружении ВТМ в проростках томата и табака выше чувствительности индикаторов с местной некротической реакцией.
4. С целью снижения фонового значения абсорбции, для получения γ-глобулинов и конъюгата, используемых для диагностики ВТМ в проростках и растениях табака, следует накапливать антиген на высоковосприимчивых к этому вирусу растениях других видов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атабеков И. Г. Практикум по общей вирусологии. — М.: Изд-во МГУ, 1981, с. 72—73 — 2. Беседина В. А. Вирусные болезни томатов в Краснодарском крае и оздоровление семенного материала от ВТМ. — Тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции. Л.: ВНИИ растениеводства, 1981, т. 69, вып. 2, с. 135—138. — 3. Бобкова А. Ф., Чирков С. Н. Применение иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний растений/Обзор — С.-х. биология, 1983, № 5, с. 32—36. — 4. Молдован М. Я. Вирусные и микоплазменные болезни табака в Молдавской ССР. — Автореф. докт. дис. Кишинев, 1979. — 5. Николаева О. В. Новиков В. К. и др. Определение М- и S-вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа. — С.-х. биология, 1985, № 2, с. 96—102. — 6. Шмыгля В. А., Макаев С. Ш., Актаа С. Особенности диагностики вируса табачной мозаики при передаче его семенами томатов и табака. — С.-х. биология, 1984, № 11, с. 60—62. — 7. Broadbent L. — Ann. Appl. Biol., 1965, vol. 56, N 2, p. 177—205. — 8. Bewley W. F., Corbett W. — Ann. Appl. Biol., 1930, vol. 17, N 2, p. 260—266. — 9. Crowley N. C. — Austr. J. Biol. Sci., 1955, vol. 8, N 1, p. 56—67. 10. Clark M. F., Adams A. N. — J. Gen. Virol., 1977, N 34, p. 475—483. — 11. Holmes F. O. — Bot. Gazette, 1929, vol. 87, N 1, p. 39—55. — 12. McLaughlin M. R., Barnett O. W., Gibson P. B., Burrows P. M. — Phytopathology, 1984, vol. 74, N 8, p. 965—969. — 13. Maury Y. et al. — Seed Sci. Technol., 1983, vol. 11, N 3, p. 491—503. — 14. Nolan P. A., Campbell R. N. — Plant Disease, 1984, vol. 68, N 11, p. 971—975. — 15. Nakane P. K., Kowoi A. — Histochem. a. Cytochem., 1974, vol. 22, N 10, p. 1084—1091. — 16. Van Regenmortel M. H. V., Burckard I. — Virology, 1980, vol. 106, N 2, p. 327—334. — 17. Van Unurde J. W. L., Maat D. L. — Seed Sci. Technol., 1983, vol. 11, N 3, p. 505—513. — 18. Wetzler Chr., Schuster G. — Biol. Plant., 1983, vol. 25, N 2, p. 147—150.

Статья поступила 27 марта 1985 г.

SUMMARY

Immunofermment analysis method has been tested for diagnosis of tobacco mosaic virus infection in tomatoes and Turkish tobacco *Nicotiana tabacum* L. In view of comparing the results obtained the same series of seeds, seedlings and plants of tomatoes and tobacco obtained from separated leaves inoculated by *N. glutinosa* L. and *N. tabacum* — *N. glutinosa* (2-phase inoculation) have been diagnosed.

The method studied is shown to be suitable for determining the degree of contaminating the seeds, seedlings and plants of tomatoes and tobacco with tobacco mosaic virus. Its sensitiveness is higher than that of methods applying indicators with local necrotic reaction.