

УДК 635.21.632.3.07

Е.В. Радкович, Г.Н. Гуца

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству», аг. Самохваловичи, Минский район

E-mail: l-radkovich@tut.by

**ОТБОР БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ Х- И Y- ВИРУСА
КАРТОФЕЛЯ****РЕЗЮМЕ**

В статье приведены результаты исследований по отбору белорусских изолятов ХВК и YВК, предназначенных для проведения искусственного заражения растений-накопителей при получении препаративного количества вирусов картофеля.

Показано, что для получения максимального количества вирусного препарата важно подобрать такой изолят, при заражении которым растение-накопитель будет эффективно накапливать вирус.

Ключевые слова: картофель, вирус, иммуноферментный анализ, изолят, индексация, полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Высокая вредоносность вирусных болезней картофеля обусловлена тем, что под воздействием инфекции ухудшается рост и развитие растений, снижаются урожайность и качество клубней [1].

В связи с этим возникает необходимость применения высокоспецифичных и чувствительных лабораторных методов ИФА и ПЦР, позволяющих оценить вирусологическую ситуацию на посевах картофеля. Главной целью использования лабораторных методов в оригинальном семеноводстве является получение качественного здорового семенного материала, соответствующего требованиям существующих технических нормативных правовых актов [2]. Следует отметить, что из всех лабораторных методов диагностики метод иммуноферментного анализа является наиболее технологичным и адаптированным для проведения массового тестирования на скрытую зараженность картофеля вирусными болезнями. Современные диагностические системы для ИФА скрытой вирусной инфекции картофеля должны характеризоваться высокой чувствительностью и специфичностью, а также максимальной автоматизацией и, как следствие, стандартизацией большинства этапов анализа. Не менее важно добиваться уменьшения вероятности субъективной оценки результатов и снижения роли человеческого фактора. При производстве тест-систем необходимо использовать изоляты, циркулирующие в определенной местности, что позволит повысить чувствительность производимых диагностикумов.

Для получения диагностических тест-систем по выявлению скрытой вирусной инфекции необходимо иметь чистый вирусный препарат в достаточном количестве. Для накопления вируса используются растения, способные накапливать вирус без потери антигенных свойств. Так, например, растения табака сортов Самсун и Барлей способны накапливать YVK в высоких концентрациях, растения дурмана хорошо накапливают ХВК и ВСЛК [3]. Однако концентрация вируса зависит не только от используемых растений накопителей, но и от штаммовой принадлежности самого вируса [4].

В связи с этим целью наших исследований явилось выделение белорусских изолятов Х- и Y-вируса картофеля с применением метода индексации в комплексе с ИФА-диагностикой и ПЦР-анализом для последующего введения в культуру *in vitro* отобранных изолятов с последующим созданием банка белорусских изолятов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Исследования проводили в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» в 2014 г. В качестве опытного материала использовали клубни картофеля сортов белорусской и зарубежной селекции, подобранные по устойчивости к Х- и Y-вирусу картофеля. Для выполнения исследований проводили индексацию отобранных клубней. Проведение индексации клубней заключалась в отмытии, просушивании, маркировке и проращивании на свету при температуре 18–21 °С. Когда ростки достигали 5–7 мм, их вырезали с сектором около ростковой ткани клубня диаметром около 2 см и оставляли на 24–48 ч для опробковения, после чего индексы высаживали в агроперлитовый субстрат. Выращивание индексов осуществляли при температуре 18–20 °С и освещенности 3000–4000 люкс при 16-часовом световом фотопериоде. Когда растения достигли высоты 15–18 см, проводили анализ листового материала индексов на наличие вирусной инфекции методом ИФА. Иммуноферментный анализ выполняли наборами биохимических реагентов разных производителей: наборы Центра (Беларусь) и Agdia (США). Оценку результатов осуществляли при помощи фотометра «BIO-RAD 680» при длине волны 405 и 490 нм.

По результатам иммуноферментного анализа отобранные образцы, несущие белорусские изоляты Х-, Y-вирусной инфекции, протестировали методом ПЦР-анализа на наличие Х, Y, S, M, L, A вирусов и вириона веретеновидности клубней картофеля для подтверждения наличия моноинфекции в отобранном материале. Тестирование проводили ПЦР-методом в формате FLASH, используя диагностические наборы ООО «АгроДиагностика» (Россия) [5]. Детекцию результатов осуществляли на иммунофлуорисцентном ПЦР-детекторе «Джин» (ДНК-технология, Россия), работающем при длинах волн возбуждения/излучения 460/515 и 532/570, выдающем результаты в виде относительных единиц к среднему значению фона.

Отобранные по результатам анализа образцы были использованы для инфицирования растений-накопителей и дальнейшего получения очищенного вирусного препарата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Целью наших исследований являлся отбор белорусских изолятов Х- и Y-вируса картофеля.

Опытный материал (клубни картофеля) был условно распределен на 5 групп:

- 1 – образцы с высокой устойчивостью к Х- и Y-вирусу;
- 2 – образцы с высокой устойчивостью к Х-вирусу и средней устойчивостью к Y-вирусу;
- 3 – образцы со средней устойчивостью к Х-вирусу и высокой устойчивостью к Y-вирусу;
- 4 – образцы с высокой устойчивостью к Х-вирусу и низкой устойчивостью к Y-вирусу;
- 5 – образцы относительно устойчивые к Х- и Y-вирусу.

Следующим этапом работы являлось проведение индексации подготовленного экспериментального материала картофеля. Полученные растения-индексы протестировали методом ИФА на наличие моноинфекции ХВК-наборами с пероксидазной меткой собственного производства и YВК-наборами США с фосфатазным маркером. В результате проведенного тестирования было отобрано 7 образцов, несущих моноинфекцию Х- и Y-вируса картофеля. Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты отбора образцов, зараженных белорусскими изолятами Х- и Y-вируса картофеля

Группа образцов	Протестировано образцов, шт.	Номер отобранного образца, шт.	
		ХВК	YВК
Образцы с высокой устойчивостью к Х- и Y-вирусу	277	Я-85	К-70 Д-96 М-100
Образцы с высокой устойчивостью к Х-вирусу и средней устойчивостью к Y-вирусу	66	П-73 П-97	–
Образцы со средней устойчивостью к Х-вирусу и высокой устойчивостью к Y-вирусу	99	–	–
Образцы с высокой устойчивостью к Х-вирусу и низкой устойчивостью к Y-вирусу	35	–	–
Образцы относительно устойчивые к Х- и Y-вирусу	62	–	А-63
Всего	539	3	4

Общее количество протестированных образцов составило 539 шт. В группе образцов с высокой устойчивостью к Х- и Y-вирусу протестировано методом ИФА 277 образцов, из которых отобраны несущие моноинфекцию как ХВК, так и YВК. В данной группе были выделены 4 образца: Я-85 – несущий Х-вирус картофеля, и К-70, Д-96, М-100 – несущие Y-вирус картофеля.

В следующей группе образцов с высокой устойчивостью к Х-вирусу и средней устойчивостью к Y-вирусу было протестировано 66 шт., выявлено 2 образца П-73 и П-97, которые содержали моноинфекцию Х-вируса картофеля.

При тестировании 99 образцов из группы со средней устойчивостью к Х-вирусу и высокой устойчивостью к Y-вирусу образцы, несущие моноинфекцию ХВК и YВК, не выявлены. Такая же картина наблюдалась при тестировании 35 образцов группы с высокой устойчивостью к Х-вирусу и низкой устойчивостью к Y-вирусу.

Пятая группа образцов с относительной устойчивостью к Х- и Y-вирусу картофеля была представлена 62 образцами. Моноинфекция ХВК не выявлена ни в одном образце, YВК обнаружен в А-63.

Все отобранные образцы были протестированы методом ИФА на наличие специфичной реакции. В результате проведенного анализа выявлено, что все отобранные образцы специфичны, то есть не содержат примеси других вирусов (табл. 2).

Значения оптической плотности отобранных образцов П-73, П-97 и Я-85, несущих ХВК, составляли 1,707, 1,708 и 0,842 ед. соответственно.

По результатам ИФА значения оптической плотности у образцов, несущих YВК, составляли от 0,538 до 1,511 ед., при этом значения положительного и отрицательного контроля были 1,250 и 0,130 ед.

Таблица 2 – Значения оптической плотности при определении специфичности отобранных образцов методом ИФА

Отобранный образец	Антиген					
	ХВК (A ₄₉₀)	YВК (A ₄₀₅)	SBK (A ₄₀₅)	MBK (A ₄₀₅)	ВСЛК (A ₄₀₅)	ABK (A ₄₀₅)
П-73 (ХВК)	1,707	0,113	0,129	0,129	0,102	0,098
П-97(ХВК)	1,708	0,125	0,133	0,128	0,111	0,107
Я-85(ХВК)	0,842	0,132	0,139	0,132	0,107	0,111
К-70(YВК)	0,046	1,448	0,133	0,132	0,098	0,098
Д-96(YВК)	0,065	1,511	0,121	0,138	0,093	0,100
А-63(YВК)	0,045	0,538	0,133	0,136	0,096	0,090
М-100(YВК)	0,044	0,561	0,136	0,117	0,094	0,090
Среднее значение оптической плотности: отрицательного контроля	0,067	0,130	0,135	0,127	0,103	0,101
положительного контроля	1,944	1,250	1,368	1,532	0,828	0,960

Следует отметить, что все образцы несли моноинфекцию ХВК или УВК. Значения оптической плотности на наличие других антигенов находились в пределах 0,044–0,139 ед., что близко по значению к средним значениям оптической плотности отрицательного контроля.

В результате проведенных исследований отобраны изоляты к Х- и У-вирусу картофеля из группы образцов с высокой устойчивостью к Х- и У-вирусу (ХВК: Я-85 и УВК: К-70, Д-96, М-100). Два изолята к ХВК (П-73 и П-97) отобраны в группе образцов с высокой устойчивостью к Х-вирусу и средней устойчивостью к У-вирусу, изоляты к У-вирусу картофеля в данной группе не обнаружены. Еще один изолят к УВК (А-63) выявлен в группе образцов, относительно устойчивых к Х- и У-вирусу.

Отобранные образцы были высажены в помещении защищенного грунта для дальнейших исследований и последующего введения выявленных белорусских изолятов в культуру *in vitro*.

Во время вегетации картофельных растений, выращенных из отобранных образцов, был проведен ПЦР-анализ на наличие вирусной моноинфекции, а также на присутствие в исследуемых образцах вириона веретеновидности клубней картофеля (табл. 3). По результатам проведенного анализа были выбракованы два образца:

1) А-63 (УВК), так как в нем была обнаружена примесь ХВК, при этом УВК, который был выявлен методом ИФА, не обнаружен методом ПЦР;

2) М-100 (УВК), в этом образце методом ПЦР наличие У-вируса картофеля не подтверждено.

В итоге по результатам ПЦР-анализа было отобрано 5 изолятов: П-73 (ХВК), П-97 (ХВК), Я-85 (ХВК), К-70 (УВК) и Д-96 (УВК). Все отобранные изоляты, несущие Х- и У-вирус картофеля, были использованы в качестве инфекторов при инокуляции растений-накопителей, из которых в дальнейшем был выделен и очищен вирусный препарат.

Для мониторинга накопления специфичного вируса в растениях-накопителях был выполнен иммуноферментный анализ (табл. 4). Для тестирования использовали наборы с фосфатазной ферментативной меткой фирмы Agdia. Установлено, что все три образца растений дурмана обыкновенного, зараженные

Таблица 3 – Результаты тестирования отобранных изолятов методом ПЦР-анализа

Изолят	Патоген						
	ХВК	УВК	СВК	МВК	ВСЛК	АВК	ВВКК
П-73 (ХВК)	+	–	–	–	–	–	–
П-97 (ХВК)	+	–	–	–	–	–	–
Я-85 (ХВК)	+	–	–	–	–	–	–
К-70 (УВК)	–	+	–	–	–	–	–
Д-96 (УВК)	–	+	–	–	–	–	–
А-63 (УВК)	+	–	–	–	–	–	–
М-100 (УВК)	–	–	–	–	–	–	–

Таблица 4 – Значения оптической плотности при тестировании растений-накопителей методом иммуноферментного анализа при А405

Образец	Растение-накопитель	Антиген					
		ХВК	УВК	СВК	МВК	ВСЛК	АВК
П-73(ХВК)	Дурман обыкновенный	3,299	0,099	0,140	0,132	0,103	0,112
П-97(ХВК)	Дурман обыкновенный	3,311	0,104	0,120	0,124	0,095	0,090
Я-85(ХВК)	Дурман обыкновенный	2,590	0,08	0,104	0,108	0,095	0,105
Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля		0,128	0,127	0,133	0,122	0,127	0,138
Среднее значение оптической плотности положительного коммерческого контроля		3,258	3,159	1,879	3,251	1,222	2,608
К-70(УВК)	Табак сорта Самсун	0,124	1,914	0,099	0,134	0,092	0,079
Д-96(УВК)	Табак сорта Самсун	0,166	2,165	0,093	0,153	0,111	0,122
Среднее значение оптической плотности отрицательного контроля		0,124	0,128	0,111	0,113	0,116	0,098
Среднее значение оптической плотности положительного коммерческого контроля		3,245	3,214	1,015	3,265	1,479	2,045

белорусскими изолятами ХВК, содержали моноинфекцию. При этом значения оптической плотности были высокими и составляли 2,590–3,311 ед.

Тестирование образцов растений-накопителей У-вируса картофеля (табак сорта Самсун) также показало наличие моноинфекции. Значения оптической плотности составляло 1,914 ед. (инфектор К-70) и 2,165 (инфектор Д-96).

Для определения эффективности накопления вирусной инфекции растениями-накопителями было выполнено выделение и очистка вирусного препарата с использованием одной и той же методики В.К. Новикова с модификациями лаборатории иммунодиагностики картофеля Центра [6].

В результате проведенной работы было получено разное количество вирусного препарата (табл. 5). При выделении и очистке вирусного препарата из листьев дурмана обыкновенного (*Datura stramonium* L.), инфицированного соком изолята Я-85, было получено наибольшее количество вируса – 68,7 мг/кг. Несколько ниже был выход вирусного препарата для растений-накопителей, где инфекторами служили изоляты П-97 и П-73, количество выделенного вируса составило 44,8 и 22,4 мг/кг соответственно.

Для накопления У-вируса картофеля мы использовали растения табака *Nicotiana tabacum* L. (сорт Самсун). В качестве инфекторов послужили два изолята: Д-96 и К-70. При выделении вирусного препарата из листьев растений табака, инфицированных изолятом Д-96, количество полученного вируса составило 5,9 мг из 1 кг зеленой массы. Использование изолята К-70

Таблица 5 – Результаты выделения вирусного препарата ХВК и УВК из свежего листового материала растений-накопителей

Об-разец	Растение-накопитель	Масса навески свежего листового материала, г	Концентрация вирусного препарата, мг/мл	Объем вирусного препарата, мл	Количество полученного вируса из 1000 г зеленой массы, мг
ХВК					
П-97	<i>Daturas tramonium L.</i>	200	1,6	5,6	44,8
П-73		446	1,75	5,72	22,4
Я-85		300	3,6	5,72	68,7
УВК					
Д-96	<i>Nicotiana tabacum L.</i> (сорт Самсун)	195	0,26	4,52	5,9
К-70		200	0,45	5,36	12,05

для искусственного инфицирования растений табака позволило получить 12,05 мг/кг чистого вирусного препарата.

Анализ полученных данных показал, что ХВК хорошо накапливается в растениях дурмана обыкновенного, но эффективнее всего в случае, когда в качестве инфектора служил изолят Я-85. Использование табака сорта Самсун в качестве накопителя вирусной инфекции эффективно, но следует учитывать, что количество вируса, полученного при очистке листьев табака, где в качестве инфектора использовали изолят К-70, гораздо продуктивнее, чем при использовании изолята Д-96.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для отбора белорусских изолятов Х- и У-вируса картофеля нами были проведены комплексные исследования клубневого материала картофеля. По результатам проведенных анализов на этапе иммуноферментного анализа было отобрано 7 образцов, несущих моноинфекцию Х- и У-вируса картофеля. Для подтверждения полученных результатов был проведен ПЦР-анализ по вегетирующим растениям. В итоге из семи образцов два не содержали искомый антиген и были выбракованы. Остальные образцы, несущие белорусские изоляты Х- и У-вируса картофеля, были введены в культуру *in vitro*.

Установлено, что отбор изолятов к Х- и У-вирусу картофеля следует проводить на образцах картофеля с высокой устойчивостью к Х- и У-вирусу.

Исследования по отбору белорусских изолятов Х- и У-вируса картофеля и поиск эффективных сочетаний «изолят-накопитель», позволяют получать вирус в высоких концентрациях для дальнейшей иммунизации животных при производстве наборов реагентов для проведения ИФА. За счет более высокой накопительной способности растений снизятся затраты на выращивание растений-накопителей, выделение и очистку вирусного препарата.

Список литературы

1. Сорока, С.В. Вирусы и вирусные болезни сельскохозяйственных культур / С.В. Сорока, Ж.В. Блоцкая // Защита растений / Белорус. НИИ защиты растений. – Несвиж, 2009. – 127 с.
2. Положение о семеноводстве картофеля в Республике Беларусь / РУП «Науч.-практ. центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству»; сост. С.А. Турко, И.И. Колядко, В.И. Дударевич. – Самохваловичи, 2012. – 22 с.
3. Блоцкая, Ж.В. Вирусные болезни картофеля / Ж.В. Блоцкая. – Минск: Навука і тэхніка, 1993. – 222 с.
4. Радкович, Е.В. Накопление X-, Y-, M-, S-вирусов картофеля в различных растениях-хозяевах для получения антигенов и производства диагностических антисывороток / Е.В. Радкович // Защита растений: сб. науч. тр. / РУП «Ин-т защиты растений». – Несвиж, 2009. – № 33. – С. 31–34.
5. Инструкция по применению реагентов для проведения ПЦР амплификации ДНК фитопатагенов / АгроДиагностика. – М., 2009. – 3 с.
6. Метод получения препарата Y-вируса картофеля и приготовление диагностических антисывороток / В.К. Новиков [и др.] // С.-х. биология. – 1982. – № 5. – С. 706–711.

Поступила в редакцию 11.11.2015 г.

E.V. RADKOVICH, G.N. GUSCHA

SELECTION OF BELARUSIAN X-AND Y-ISOLATES OF POTATO VIRUS

SUMMARY

The research results on the selection of the Belarusian isolates PVX and PVY viruses of potato are intended for the artificial infection of plants drives to obtain preparative amounts of potato viruses.

It is shown that it is important to maximize the number of viral preparation and to pick the isolates during infection which the plant will effectively accumulate the virus.

Key words: potato, virus, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), isolate, indexing, polymerase chain reaction (PCR).