

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина

УДК 635.24:632.937.16:576.8.077

На правах рукописи

БЕЙСЕМБИНА БИБИГУЛЬ

**Молекулярно-биологическое обоснование устойчивости
сортов картофеля к штаммам PVY**

6D080100 – Агрономия

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор
К.М. Мусынов

Научный консультант
кандидат биологических наук,
доцент
В.Т. Хасанов

Научный консультант
кандидат биологических наук,
С.Г. Вологин

Республика Казахстан
Нур-Султан, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	4
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	7
ВВЕДЕНИЕ	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Биологическая характеристика, вредоносность и распространение вирусов картофеля.....	13
1.2 Y-вирус картофеля.....	17
1.2.1 Строение и размножение PVY.....	18
1.2.2 Штаммы Y-вируса картофеля.....	19
1.2.2.1 Биологическая характеристика изолятов PVY.....	20
1.2.2.2 Серологическая характеристика изолятов PVY.....	22
1.2.2.3 Молекулярная характеристика изолятов PVY: определение филогенетических групп и рекомбинационный анализ.....	23
1.3 Устойчивость картофеля к PVY.....	29
1.3.1 Гены устойчивости к PVY.....	31
1.3.2 ДНК-маркеры.....	34
1.4 Методы диагностики PVY.....	35
1.4.1 Визуальный метод диагностики PVY.....	36
1.4.2 Биологическое тестирование с индикаторными растениями.....	38
1.4.3 Иммунодиагностика PVY.....	39
1.4.3.1 Очистка вирусов.....	41
1.4.3.2 Получение специфических антисывороток – основных реагентов при создании тест-систем.....	42
1.4.4 Молекулярно-генетические методы диагностики PVY.....	47
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
2.1 Материалы исследований.....	51
2.2 Методы исследований.....	52
2.2.1 Отбор проб для тестирования на зараженность вирусами.....	52
2.2.2 ПЦР-анализ.....	52
2.2.3 Метод иммуноферментного анализа.....	54
2.2.4 Индикаторная диагностика штаммовой принадлежности PVY, накопление вируса в тест-растениях.....	55
2.2.5 Размножение растительного материала.....	56
2.2.6 Иммунизация лабораторных животных, очистка поликлональных антител и получение конъюгатов.....	56
2.2.7 Определение точки термической инактивации, периода сохранения инфекционности и предельного разведения сока.....	58
2.2.8 Определение вирусостойчивости сортов картофеля методом механической инокуляции.....	58
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1 Скрининг вирусных заболеваний в картофелеводческих посадках	

Республики Казахстан и поиск естественно инфицированных PVY клонов картофеля.....	59
3.2 Идентификация штаммовой принадлежности отечественных изолятов Y-вируса картофеля.....	62
3.2.1 Изолят Cherie №10.....	69
3.3 Создание коллекции изолятов PVY и поддержание в культуре изолированных органов и тканей растений.....	70
3.4 Разработка отечественной иммуноферментной тест-системы для выявления PVY.....	78
3.4.1 Получение вирусного препарата.....	79
3.4.2 Получение специфических поликлональных антител.....	81
3.4.3 Конструирование иммуноферментной тест-системы для диагностики PVY и ее испытание.....	83
3.5 Оценка на вирусоустойчивость сортов картофеля.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	102
ПРИЛОЖЕНИЯ	120

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001 Межгосударственный стандарт. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 2003 Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 33996-2016 Межгосударственный стандарт. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Антиген – чужеродное вещество для организма, которое способно вызвать иммунный ответ и вступить в специфическое взаимодействие с эффекторами последнего.

Антитела – белки глобулиновой природы, образующиеся в организме в ответ на введение веществ, несущих на себе признаки генетически чужеродной информации.

Биологическое тестирование – способ лабораторного выявления фитопатогенов, который основан на заражении растений-индикаторов возбудителем, содержащимся в испытуемом образце.

Вирулентность (от лат. *virulentus* – «ядовитый») – степень способности данного инфекционного агента вызывать заболевание или гибель организма.

Вирусы картофеля – мельчайшие палочковидной, нитевидной или сферической формы частицы, состоящие из белка и нуклеиновой кислоты.

Ген – элементарный наследственный фактор; элементарная единица наследственности, участок молекулы ДНК (или РНК).

Геном – совокупность генов организма.

Гибрид – организм или клетка, полученные вследствие скрещивания генетически различающихся форм.

ДНК-маркер – полиморфный признак, выявляемый методами молекулярной биологии на уровне нуклеотидной последовательности ДНК, для определенного гена или для другого участка хромосомы при сравнении различных генотипов пород, сортов, линий.

Изолят – неохарактеризованная на основе биологических, физико-химических или молекулярно-биологических методов чистая культура вирусов.

Иммуноферментный анализ – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело.

Инокулюм – инфекционный материал, используемый для искусственного заражения.

Инокуляция вирусной инфекцией – передача вируса или их комплекса в экспериментальных целях от одного организма к другому.

Исходный материал – культурные и дикие формы растений, используемые для выведения новых сортов.

Каллус – недифференцированные клетки, являющиеся тотипотентными и способные поэтому дать начало целому растению.

Конъюгат – специфические антитела, меченые ферментом.

Метод *in vitro* – выращивание живого материала “в стекле” (вне живого организма – в пробирке, чашке Петри, колбе) на искусственных питательных средах в стерильных условиях.

Метод *in vivo* – выращивание живого материала в естественных условиях.

Патогенность – видовой генетический признак возбудителя, его потенциальная возможность вызывать при благоприятных условиях специфический инфекционный процесс.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Праймер – короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени; служит затрРVАой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при репликации ДНК).

Резистентность (от лат. *resistentia* – сопротивление, противодействие) – сопротивляемость (устойчивость, невосприимчивость) организма к воздействию различных факторов.

Сверхчувствительность (реакция сверхчувствительности) – при которой происходит гибель клеток хозяина в местах проникновения патогена. Мертвые клетки становятся для патогена барьером, изолирующим его от живой ткани

Сорт – совокупность растений, созданная в результате селекции и обладающие определенными, передающимися по наследству признаками.

Тест-растения – растения, реагирующие на инокуляцию вирусами локальными (местными) симптомами и системной реакцией в виде мозаик, некрозов и др.

Титр – уровень биологической активности антигена или антител.

Толерантность – способность растения сохранять удовлетворительную урожайность и качество продукции при поражении возбудителем болезни или повреждении вредителем.

Устойчивость – способность сорта растения ограничивать рост и развитие определенных вредителей или патогенов, а также причиняемый ими ущерб в сравнении с восприимчивыми сортами при одинаковых условиях среды и патогенном давлении.

Штамм – чистая культура вирусов изолированная в определённое время и в определённом месте.

Экстинция – ослабление пучка света при его распространении в веществе за счёт действия поглощения света и рассеяния света.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

га	– гектар
г	– грамм
г.	– год
гг.	– годы
°С	– показатель температуры по градуснику Цельсия
%	– процент
т/га	– тонна на гектар
об/мин	– оборотов в минуту
нг/мл	– нанограмм на миллилитр
мкг/мл	– микрограмм на миллилитр
мг/мл	– миллиграмм на миллилитр
мл	– миллилитр
нм	– нанометр
шт	– штук
мин	– минут
М	– моль
ИФА	– иммуноферментный анализ
о.е.	– оптические единицы
ХАо	– среднее значение экстинции образца
Ак	– среднее значение экстинции отрицательного контроля
Р	– результат тестирования
-	– отсутствие вируса ($A_o/A_k < 2,0$)
+	– достоверное наличие вируса ($A_o/A_k > 3,0$)
+/-	– недостоверное наличие вируса ($A_o/A_k=2,0-3,0$)
ПЦР	– полимеразная реакция
<i>Ry-and</i>	– ген экстремальной устойчивости, выявленный у вида картофеля <i>Solanum andigenum</i>
<i>Ry-sto</i>	– ген экстремальной устойчивости, выявленный у вида картофеля <i>Solanum stoloniferum</i> коррелирует со стерильностью
<i>Ry-fsto</i>	– ген экстремальной устойчивости, выявленный у вида картофеля <i>Solanum stoloniferum</i> коррелирует с фертильностью
<i>Ry-chc</i>	– ген экстремальной устойчивости, выявленный у вида картофеля <i>Solanum chacoense</i>
СВЧ	– сверхчувствительность
МОС	– маркер-ориентированная селекция
ЗФР	– забуференный физиологический раствор
pH	– кислотность раствора (концентрация ионов водорода)
PVY	– Potato virus Y, Y-вирус картофеля
PLRV	– Potato leaf roll virus, вирус скручивания листьев картофеля
PVX	– Potato virus X, X-вирус картофеля
PVM	– Potato virus M, M-вирус картофеля
PVS	– Potato virus S, S-вирус картофеля

PVA	– Potato virus A, A-вирус картофеля
PC	– положительный контроль
NC	– отрицательный контроль
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	– рибонуклеиновая кислота
кДНК	– комплементарная ДНК
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфат
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота
п.н.	– пар нуклеотидов (bp)
ОТ	– обратная транскрипция
ОФД	– орто-фенилендиамин
PTNRD	– болезнь некротической кольцевой пятнистости клубней
PVY ^N	– штамм некроза жилок табака
PVY ^{N-Wi}	– некротический штамм Y-вируса картофеля Wilga, PVY ^{Wilga}
PVY ^O	– обыкновенный штамм Y-вируса картофеля
PVY ^C	– штамм акропетального некроза
PVY ^{NTN}	– некротический штамм кольцеобразного некроза клубней картофеля
PVY ^Z	– штамм, преодолевший гены устойчивости Ny, Nc
PVY ^E	– штамм, преодолевший гены устойчивости Ny, Nc и Nz
N.t.	– <i>Nicotiana tabacum</i> L. (табак курительный)
Native	– нативный (неразведенный сок тест-растений)

ВВЕДЕНИЕ

Большинство вегетативно размножаемых продовольственных, кормовых, технических и цветочно-декоративных культур хронически заражено вирусами, которые вызывают ощутимые потери урожая и заметно ухудшают качество сельскохозяйственной продукции [1]. Среди обнаруженных за последнее десятилетие новых инфекционных болезней растений почти половина имеет вирусную природу [2].

В настоящее время в Республике Казахстан средняя урожайность важнейшей сельскохозяйственной культуры картофеля находится в пределах 19,5 т/га. [3]. В то же время в ряде зарубежных стран с развитым картофелеводством (Нидерланды, США, Израиль, Германия) средняя урожайность картофеля составляет 45-50 т/га. Согласно данным ФАО (Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций), общемировые потери урожая культуры картофеля от инфекций каждый год составляют более 90 млн. тонн. Причем наиболее вредоносными являются вирусные болезни картофеля. Ущерб, приносимый вирусной инфекцией, колеблется в диапазоне от 15 до 95% [4]. Одним из основных вирусов, поражающий картофель и вызывающий сильные потери урожая (50% и более в зависимости от сорта, условий культивирования и штамма) является PVY [5]. Важнейшим вопросом для культивирования картофеля является контроль вирусных заболеваний, поэтому поиск источников устойчивости к вирусам – актуальная задача для селекции.

В настоящее время различают четыре основных типа устойчивости растений к фитопатогенам: экстремальная устойчивость (иммунитет, полная невосприимчивость), сверхчувствительность, полевая (неспецифическая) устойчивость и толерантность [6]. Создание в ходе классического селекционного процесса новых сортов, устойчивых к PVY, наряду с безвирусным семеноводством картофеля, является эффективным способом предотвращения поражения картофеля вирусными болезнями. Основой для этого, на протяжении всего XX века, служил перенос в генетический материал культурного тетраплоидного картофеля (*Solanum tuberosum* L.) доминантных аллелей генов экстремальной устойчивости *Ry-and*, *Ry-fsto*, *Ry-sto* и *Ry-chc*, выявленных у полукультурных и диких видов картофеля *S. andigenum*, *S. stoloniferum* и *S. chacoense*. Наличие доминантных аллелей этих генов в генотипе растений картофеля обеспечивает высокий уровень защиты растений картофеля от всех, известных в настоящее время, штаммов PVY [7]. Членство Казахстана в Евразийском экономическом союзе и Всемирной торговой организации создает возможности и одновременно предъявляет высокие требования к конкурентоспособности, как на внутреннем, так и на внешнем рынке [8]. К сожалению, конкурентоспособность отечественных сортов картофеля в связи с неохарактеризованностью по устойчивости к вирусам картофеля, а также их штаммам в отличие от сортов зарубежной селекции оставляет желать лучшего. В этой связи для оценки отечественного генофонда

требуется мониторинг видового и штаммового состава вредоносных вирусных патогенов, а также молекулярный скрининг сортов и гибридов картофеля.

Цель и задачи исследования.

Целью диссертационной работы является изучение устойчивости сортов картофеля к штаммам PVY, распространенным на территории Республики Казахстан.

Для выполнения цели работы были поставлены следующие задачи:

1) скрининг вирусных заболеваний в картофелеводческих хозяйствах РК высокочувствительными методами диагностики, отбор здоровых сортов и моноинфицированных PVY клонов картофеля;

2) идентификация штаммовой принадлежности Y-вируса картофеля у отобранных клонов картофеля;

3) создание коллекции и поддержание в культуре изолированных органов и тканей растений, инфицированных штаммами PVY;

4) разработка отечественной иммуноферментной тест-системы для выявления штаммов PVY;

5) выявление маркеров генов устойчивости к PVY у отечественных сортов и гибридов картофеля, оценка на вирусоустойчивость.

Объекты исследования: сорта, гибриды и селекционные линии картофеля отечественной селекции.

Предмет исследования: Y-вирус картофеля.

Методы исследования. При проведении исследований применялись молекулярные, молекулярно-биологические, генетические, иммунохимические, биотехнологические, фитопатологические методы.

Научная новизна. Новизна исследований заключается в том, что впервые проведен скрининг вирусов картофеля в различных регионах Республики Казахстан, используя современные методы диагностики, а также разработана и запатентована отечественная тест-система ИФА для выявления PVY. Впервые в стране проведены исследования распространения штаммов PVY, секвенирование, филогенетический анализ казахстанских изолятов вируса, выявлены местные рекомбинантные штаммы, которые были депонированы в базе GenBank. Впервые проведено изучение устойчивости сортов картофеля к штаммам PVY, выявлены сорта, содержащие экстремальные гены устойчивости к вирусу.

Практическая и теоретическая значимость. Практическая и теоретическая значимость заключается в характеристике отечественных сортов (гибридов, селекционных линий) картофеля по устойчивости к PVY что может быть использовано в селекции картофеля в качестве исходного материала при создании новых сортов, обладающих устойчивостью к PVY. Полученные результаты исследований будут использоваться при каталогизации сортов, в селекционных программах, что будет способствовать повышению конкурентоспособности отечественных сортов картофеля и урожайности данной культуры в республике в целом. Полученные результаты исследований, значительно расширяют знания в области молекулярной биологии PVY. По

результатам исследований был разработан отечественный иммуноферментный диагностикум, обладающий высокой чувствительностью и способный выявлять штаммы PVY.

Основные положения, выносимые на защиту:

- распространение вирусов картофеля в различных регионах страны;
- штаммовая идентификация PVY, инфицирующего возделываемые в Республике Казахстан сорта картофеля;
- разработка тест-системы ИФА для диагностики штаммов PVY;
- выявление генов устойчивости к PVY в казахстанском генофонде картофеля.

Апробация работы. Основные положения диссертации были доложены и опубликованы в материалах научно-практических конференций: Республиканская научно-практическая конференция «Сейфуллинские чтения-13: Сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина на тему: «Размножение изолятов Y-вируса картофеля в культуре ткани *N. tabacum*» (Астана, 2017); Республиканская научно-практическая конференция «Сейфуллинские чтения-13: Сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина на тему: «Изучение физических свойств казахстанских изолятов Y-вируса картофеля» (Астана, 2017); Республиканская научно-практическая конференция «Сейфуллинские чтения-14: Молодежь, наука, инновации: цифровизация – новый этап развития» на тему: «Индикаторная диагностика штаммовой принадлежности казахстанского изолята Y-вируса картофеля» (Астана, 2018); Международная научно-практическая конференция «Вклад молодых ученых в развитие АПК в условиях четвертой промышленной революции» на тему: «Оценка распространения Y-вируса картофеля и дифференциация его серотипических групп в Республике Казахстан» (Алматы, 2018); Международная научно-практическая конференция «Phytosanitary security: integration into the scientific and educational space» на тему: «The results of the 1st year of testing potato varieties of Chinese selections in the conditions of Northern and Central Kazakhstan» (Астана, 2018); Международная научно-практическая конференция «Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям», посвященной 100-летию монографии Н.И. Вавилова на тему: «Первые результаты оценки сортов картофеля казахстанской селекции на наличие генов устойчивости к Y-вирусу картофеля с помощью молекулярных маркеров» (Москва, 2019); Международная научно-практическая конференция «Приоритеты агропромышленного комплекса: научная дискуссия», посвященная 30-летию Независимости Республики Казахстан на тему: «Получение вирусного препарата и диагностических антисывороток для выявления Y-вируса картофеля» (Петропавловск, 2021).

По результатам проведенных исследований опубликовано 13 научных работ, из них: 2 публикации – в журналах ККСОН МОН РК, получен евразийский патент (Приложение А), опубликована монография, что

приравнено к 2 публикациям в изданиях, рекомендованных ККСОН, 1 публикация в журнале «Plant Disease» входящем в базу данных «Web of Science» (Q1, 2020), 7 публикаций в сборниках научных конференций, а также учебное пособие.

Связь диссертации с госпрограммами. Исследования проводились в рамках программы грантового финансирования Комитета науки МОН РК по проекту: «Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов» №ГР0115РК00478, 2015-2017 гг.), а также ПЦФ МСХ РК «Трансферт высокопродуктивных сортов картофеля для безвирусного семеноводства Северного и Центрального Казахстана» (№0112РК00431, 2018-2020 гг.).

Внедрение результатов исследования.

Установленные в результате исследований устойчивые сорта картофеля казахстанской селекции включены в селекционные программы ТОО «КазНИИПО» (Приложение Б), ТОО «СХОС «Заречное» (Приложение Б), а также в качестве исходного материала для создания новых сортов картофеля в Международной научной программе «Создание перспективных линий картофеля на основе генетических ресурсов КНР и Республики Казахстан» (Dezhou Potato Trade Co., Ltd.), стартовавшей в 2019 году.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 119 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, заключение и предложения для практической селекции, список использованных источников, 5 приложений. Список использованных источников состоит из 267 наименований отечественных и зарубежных авторов. Работа содержит 18 таблиц, 22 рисунка.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологическая характеристика, вредоносность и распространение вирусов картофеля

Наиболее распространенный вид картофеля *Solanum tuberosum* L. (семейство *Solanaceae*) происходит из Южной Америки, где также был одомашнен ряд других видов картофеля. Естественная среда обитания культурных и диких видов картофеля охватывает Южную и Центральную Америку и простирается от холодной среды Андских гор на высоте 4500 м над уровнем моря до тропического климата джунглей Амазонки. Фенотипическое и генетическое разнообразие культурных и диких видов картофеля огромно [9-11]. Только очень небольшая часть генетических ресурсов картофеля была использована в селекции.

Картофель поражается большим числом заболеваний, вызываемых различными возбудителями. Наибольшую опасность представляют болезни, которые передаются с клубнями. К ним относятся вирусные, бактериальные, грибные. Богатые углеродами и водой, ботва и клубни картофеля являются благоприятной средой для их обитания. Размеры поражения картофеля болезнями зависят от многих факторов, среди которых наибольшее место занимают два: количество инфекции и наличие условий, благоприятных для ее развития. Одной из особенностей картофеля является то, что инфекция в растении может существовать в так называемой бессимптомной форме. Различают латентную и скрытую формы бессимптомного вирусносительства картофеля. При скрытой форме вирусной инфекции вирусные частицы не удается обнаружить в растениях. При латентной форме инфекции признаки болезней у растений отсутствуют или очень слабы и трудно различимы. Латентная форма бывает в тех случаях, когда возбудитель болезни не успел создать в растении необходимый запас инокулюма – вирусных частиц, бактериальных клеток или мицелия гриба. Данная форма заражения приводит к накоплению из года в год инфекции и может вызвать внезапную вспышку болезни в период вегетации растений, особенно в годы, благоприятные для ее развития [5, с. 14]. На практике размеры ущерба, причиняемого вирусными заболеваниями, определяются снижением продуктивности отдельных растений: чем больше в насаждении инфицированных растений, тем ниже урожайность той или иной сельскохозяйственной культуры. В большинстве случаев вирусные заболевания не вызывают полной гибели растений – их воздействие заключается главным образом, в снижении урожая, которое иногда приводит к полной нерентабельности посева [2, с. 21; 5, с. 8].

В настоящее время насчитывается около 40 видов вирусов картофеля, распространённых в различных почвенно-климатических регионах, из которых наиболее изучены 16 видов. К числу наиболее опасных, получивших повсеместное распространение в районах возделывания картофеля, фитопатогенных вирусов, относят: PLRV, PVY, PVA, PVX, PVM, PVS [12].

По степени вредоносности (в возрастающем порядке) вирусы располагаются таким образом: PVX, PVS, PVM, PVA, PVY, PLRV. Большую вредоносность имеют смешанные инфекции, вызываемые комплексом вирусов: PVX+PVS+PVY, PVX+PVA+PVY, PVX+PVM+PVY. В этих случаях пораженные растения имеют симптомы тяжелых форм виروزов и снижают урожай картофеля наполовину и более [4, с. 288].

PVA является возбудителем складчатой мозаики картофеля. Характерным признаком является деформированность листьев, доли закручиваются, листья волнообразные. Не редко A-вирус картофеля может находиться в растении в смеси с Y- и X-вирусами, что естественно вредоносность заболевания усиливает. Снижение урожая картофеля при смешанной инфекции достигает 60-80% [13].

PVM является вирусом мозаичного закручивания верхних листьев. M-вирус может существовать в растениях в виде «дефектной», т.е. лишенной белковой оболочки и поэтому его наличие не всегда можно обнаружить серологическим методом. Заболевание является весьма вредоносным и может снижать урожай картофеля на 30-60%.

PVX является возбудителем обыкновенной мозаики картофеля. Снижает урожай картофеля до 30% при моноинфицированности, в смеси с другими вирусами вредоносность в разы увеличивается [14].

PLRV вызывает скручивание листьев картофеля и его вырождение. Снижение урожайности зависит от сорта, окружающих условий, штамма и комплекса с остальными вирусами [4, с. 289].

Наиболее опасным и вредоносным является PVY, вызывающий морщинистую и полосчатую мозаики, при отсутствии контроля за посадочным материалом происходит быстрое вырождение сорта картофеля.

PVS является возбудителем крапчатости, или обыкновенной мозаики. Содержатся во многих сортах картофеля латентно. Урожайность снижается примерно на 10-15%, в зависимости штамма и сорта. Зараженные растения картофеля дают урожай, в котором преобладают мелкие клубни [14, с. 38].

Вирусы картофеля различаются по размеру и форме частиц. Они могут быть либо изометрическими, например, вирус скручивания листьев, либо палочковидными и нитевидными, например. По химическому составу представляют собой нуклеопротеиды и имеют специфическое строение, свойственное только данному вирусу. Фитопатогенные вирусы содержат рибонуклеиновую кислоту (РНК), большинство вирусов человека и животных, вирусы бактерий (бактериофаги) – дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) [15]. Установлено, что чистая нуклеиновая кислота вируса сохраняет инфекционные свойства, тогда как вирусный белок без нуклеиновой кислоты лишен их [16]. У вирусов нет собственного метаболизма и для своей репродукции и развития им необходима чужая живая клетка. Ни один из известных вирусов не способен размножаться на мертвых питательных субстратах [15, с. 286]. Вирусы, поражающие растения картофеля, как правило, нарушают метаболизм в клетках хозяина и вызывают необратимые изменения.

Основная масса вирусных возбудителей поражает паренхимные ткани листьев и стебля. В зараженных клетках накапливается масса, полученных в результате усиленного размножения, вирусных частиц, приводящее к нарушению физиологических процессов клетки хозяина, вызывает их истощение, а в отдельных случаях при очень тяжелых поражениях – к их гибели. Крайняя же форма патологического процесса при вирусных инфекциях – местный и системный некроз, обусловленный отмиранием тканей. В данном случае образование клубней и накопление в них крахмала почти полностью останавливается, а иногда происходит гидролиз уже накопленного крахмала [17].

В природе вирусы картофеля распространяются контактно-механическим и векторным (с помощью переносчиков) способами [13, с. 28]. Тли являются основными и наиболее распространенными переносчиками вирусной инфекции. К передаче вирусов способны личинки и нимфы, бескрылые и крылатые особи тлей. Однако корреляция между количеством отловленных тлей и распространением вирусов в пределах поля наблюдается только в отношении крылатых тлей [18]. Некоторые вирусы могут быть распространены только путем непосредственного контакта (PVX). Большинство картофельных вирусов вызывают так называемую «мозаику» или «пятнистость». Оба термина относятся к одному и тому же симптому.

Снижение урожайности под воздействием вирусов зависит от условий выращивания. Если вторично зараженных растений в посадках менее 10%, то потери будут минимальными. Первичная инфекция обычно также приводит к небольшим потерям. Поражение семенного материала вирусными заболеваниями можно ограничить также при помощи клонового отбора, ранних прочисток (удаление инфицированных растений), возделыванием в наиболее благоприятных (чистых) фитосанитарных условиях с применением пестицидов, которые убивают тлю, или препаратов, которые предотвращают распространение вирусов (минеральные масла, в случае с вирусом Y) и в случае раннего удаления ботвы с последующим уничтожением [4, с. 60].

Впервые обследования по вирусным заболеваниям картофеля в нашей стране были проведены на юго-востоке Казахстана Яцыниной К.А. в 30-х гг. XX века, в результате которых выявлена пораженность картофеля морщинистой мозаикой в среднем до 5%, на отдельных участках до 20%.

В предгорьях юга и юго-востока республики распространены скручивание листьев, морщинистая и полосчатая мозаика. Общая зараженность данными виروزами может достигать 100%. Исследования, проведенные С.Т. Бубенцовым в Казахстане в 1959-1963 гг. показали, что вирусные болезни наиболее распространены в южных и юго-восточных областях: Жамбылской, Алматинской и Южно-Казахстанской. Было установлено, что урожайность, вследствие поражения морщинистой мозаикой, снижается на 70-80%, полосчатой – на 80% [19].

Кроме того, в период 1975-1986 гг. исследования распространения вирусов в Казахстане проводились Елисейевой З. и Тулегеновым Т.

Основываясь на визуальной диагностике, а также с использованием тест-растений и метода преципитации, была установлена высокая заболеваемость полосчатой и морщинистой мозаикой – 70-80% [20, 21].

В период с 1994 по 1996 год в различных регионах Казахстана заболеваемость вирусами была изучена Манадиловой А. с помощью метода двойного наслоения антител ИФА. Пробы отбирались в Казахстане в 12 разных точках над уровнем моря, дважды за вегетационный период. Уровень зараженности вирусами достигал более 50%: PLRV – 85,7%, PVM – 85,7%, PVS – 100%, PVX – 96%, PVY – 85,7% [22-24].

Согласно следующим данным, на севере Казахстана районированные сорта картофеля были заражены различными комбинациями вирусов PVX, PVS и PVM на 95-99%. PLRV – 30%, готика – 27%, морщинистая мозаика – 16%. Кокшетауская область характеризуется слабым поражением вирусными болезнями – 0,2-12%, среди них преимущественно крапчатая мозаика. В горных районах Алматинской области пораженность вирусными болезнями картофеля также оказалась невысокой – 5-27%. В Южном регионе Казахстана, по исследованиям Оспановой Г.С. и др., в 2014 г. степень зараженности картофеля составила: PLRV – 5%, PVM – 8,5%, PVS – 31,7%, PVX – 41,9%, PVY – 14,5% [25].

По данным исследований, установленным Александровой А.М. и Екатерининской Е.М. с соавторами (2018), образцы картофеля содержали моноинфекцию только по трем вирусам: PVM – 36,13%, PVS – 0,84%, PVY – 5,88% на юго-востоке Казахстана. В северном регионе PVM являлся единственным примером моноинфекции (28,74%), а PVS и PVY были обнаружены только в составе комплексного заражения. В общем уровень единичной инфекции составил в Алматинской области 42,85 и 28,74% – Костанайской. Распространенность сложной инфекции варьировала между двумя регионами. На территории Алматинской области поражено 47,91% посадок картофеля, в то время как в Костанайской области – 52,1%. Наиболее распространенной была комбинация PVM+PVS: 26,89% в Алматы и 43,11% – в Костанайской области. Соотношение смешанной инфекции PVM+PVY оценивается в 10,08% в Алматы и 4,19% – в Костанайской области. Общее количество образцов растений картофеля свободного от вирусного поражения составила 9,24% в Алматинской области и 19,16% в Костанайской области. На территории Костанайской области лидирует по заражению растений картофеля PVM, а PVS – занимает второе место. Уровень распространения вирусами в комплексе – 52,1% [26, 27].

Таким образом, различают латентную и скрытую формы бессимптомного вирусносительства картофеля, а также первично и вторично инфицированные вирусными растениями. Снижение урожайности картофеля увеличивается, если культура поражена комплексом вирусов. Наиболее распространенными переносчиками вирусной инфекции являются тли. В Республике Казахстан распространены все 6 основных вирусов картофеля в зонах возделывания культуры в различном соотношении. Обследования посадок картофеля на

зараженность вирусозами в стране началось с 30-х годов XX века и продолжается по настоящее время, однако, при исследованиях не применялись современные высокочувствительные методы диагностики, в силу не существования их в ранние годы, а также неоснащенности материально-технической базой.

1.2 Y-вирус картофеля

Y-вирус картофеля считается одним из десяти основных вирусов сельскохозяйственных культур вследствие его всемирного распространения и экономической важности [28]. Некоторые изоляты PVY способны вызывать PTNRD в инфицированных клубнях, уменьшая товарный урожай клубней, поскольку клубни теряют товарный вид. PVY является серьезной угрозой для табака и перцовых культур и, в меньшей степени, для производства томатов и баклажанов [29-31]. Для борьбы с причиняемым экономическим ущербом разработаны обширные программы контроля распространения PVY с помощью профилактических мер, борьбы с переносчиками (тли) и селекции устойчивых к вирусам сортов картофеля.

Потери от вирусной болезни не только ограничиваются прямыми потерями продукции растениеводства, а также связаны с косвенными финансовыми потерями, такими как увеличение производственных издержек (например, селекция, обучение персонала и техническое обеспечение), затраты на диагностику (сертификация, обследования, тестирование на вирусы и др.), а иногда и социальные и экологические издержки (потеря ресурсов, смена культур и загрязнение окружающей среды). Сообщается, что только в штате Айдахо (США) прямые и косвенные экономические потери от PVY, составляют около 34 миллионов долларов в год [32]. Было подсчитано, что увеличение лишь на 1% доли PVY в семенных посадках может привести к снижению урожайности на 180 кг/га, что представляет собой потерю валового дохода около 18 долларов США за каждый гектар [33]. Наибольшие потери, связанные с PVY, наблюдаются, когда семенные клубни уже заражены (вторичная инфекция) [34, 35].

Y-вирус картофеля передается неперсистентно или механическим способом. Передача тлями является основным способом распространения вируса в природе. Известно, более 40 видов тлей, передающих PVY [36], которые отличаются между собой эффективностью переноса вируса. Среди них наиболее важными переносчиками являются – *Macrosiphon euphorbiae*, *Aphis fabae*, *Mizus persicae*, *Rhopalosiphoninus latysiphon*. Y-вирус переносится инокуляцией соком, прививкой стеблей и с клубнями. Некоторые сорта картофеля являются бессимптомными носителями вируса. На любом сорте заболевание при поражении различными штаммами проявляется по-разному. У восприимчивых сортов часто возникает некроз жилок на нижней стороне листа или сильный некроз листьев и стеблей. В последнем случае некроз вызывает стриковое опадение листьев. У вторично зараженных растений наблюдается карликовость и ломкость, сморщивание и скручивание листьев [5, с. 54].

На сегодняшний день, систематическое положение Y-вируса картофеля выглядит таким образом:

Царство *Vira*,

Группа *Potyvirus*,

Семейство *Potyviridae* [17, с. 71].

Таким образом, PVY является наиболее вредоносным вирусом картофеля, снижая урожайность культуры до 97% в зависимости от климатических условий, периода зараженности и штаммовой принадлежности. Вирус способен поражать около 400 видов растений, при этом основным растением-хозяином является картофель, на котором развиваются, при поражении, две формы заболеваний – полосчатая и морщинистая мозаики.

1.2.1 Строение и размножение PVY

Вирусные частицы – вирионы PVY – нитевидные, длиной 730 нм, с диаметром 11 нм, вирус имеет спиральную симметрию с шагом спирали в 3,3 нм. Капсид состоит из около 2000 одинаковых капсометров, размер CP 34кДа. CP состоит из 267 аминокислот [37, 38], нуклеокапсид состоит из одной нити РНК с молекулярной массой около $3 \cdot 10^6$ М [39]. Вирусные частицы Y-вируса картофеля состоят из нуклеоислоты и белковой оболочки на 5,4-6,4% и 93,6-94,6% соответственно. Вирионы у PVY^O имеют плотность 1,323 г/см⁻³, а у PVY^N плотность – 1,326 г/см⁻³ [40]. Геном Y-вируса картофеля состоит из линейной одноцепочечной смысловой цепи РНК, длиной 10,4 кб, и представляет собой единое целое. Немногочисленные белки, кодируемые вирусным геномом, отличаются многофункциональностью и обеспечивают его жизненный цикл. Так, одни белки участвуют в транспорте вируса из клетки в клетку, другие обеспечивают перенос вируса тлями и защищают вирус от проникновения в него геномной РНК других вирусов [39, p. 179].

После попадания вирусной частицы PVY в клетку растения-хозяина происходит высвобождение из белковой оболочки вирусной РНК, которая начинает усиленное копирование в цитоплазме. Обратное связывание РНК с белком связано с их переносом в клеточные включения или вироплазму. Зрелые вирусные частицы нового поколения в инфицированных клетках могут связываться в аморфные или кристаллообразные стреловидные структуры [41]. Считается, что концентрация Y-вируса картофеля в растениях сравнительно невысокая и его инактивация происходит даже при самых незначительных воздействиях неблагоприятного фактора [42]. Хотя, в большинстве случаев, освобождение вирионов происходит после гибели клетки растения-хозяина и последующего разложения мембран клеток [41, p. 62].

После того как произошло репродуцирование в одной клетке растения-хозяина, происходит дальнейшее заражение всего растения, которое осуществляется путем передвижения из одной клетки в другую молекул РНК, что обеспечивается транспортным белком вируса. Ближний транспорт в соседние клетки идет по плазмодесмам: несколько молекул транспортного белка связываются с вирусной РНК, формируя комплекс, который движется по

цитоскелету, имея скорость передвижения в пределах одной клетки два часа. Дальняя транспортировка вируса по растению происходит уже без участия транспортного белка, а пассивно с помощью флоэмного тока [42, с. 158].

В ходе электронно-микроскопических исследований, в клетках растений, пораженных Y-вирусом картофеля, обнаружены характерные включения Эдвардсона неправильной формы, состоящие из неравномерных по толщине нитей или других образований в виде колесиков и булавовидных структур [43-45]. Включения обладают иммунологическими свойствами, однако серологически отличны от белков вируса и протеинов растения [13, с. 31]. Включения Эдвардсона могут брать за диагностический признак поражения растения вирусом, поскольку в здоровых клетках растений они отсутствуют [45, с. 221].

Температура термической инактивации вируса находится в пределах 50-74°C, нагревание инфекционного сока в течении 10 минут при 56-60°C также инактивирует вирус. Выстаивание сока при комнатной температуре от нескольких часов до двух дней приводит к потере инфекционности Y-вируса картофеля [46]. Кроме того, вирус чувствителен к концентрации водородных ионов в растворе, вирионы стабильны при значении pH 7-8 [47].

Таким образом, Y-вирус картофеля состоит из цепи РНК и белков, имеющих различные функции. Размножение вируса происходит в цитоплазме клетки растения-хозяина. Наличие включений Эдвардсона в клетках растений, пораженных Y-вирусом картофеля, используется как диагностический признак, температура инактивации вируса 50-74°C.

1.2.2 Штаммы Y-вируса картофеля

Одной из характеристик вирусов является их способность мутировать и рекомбинировать с гораздо большей скоростью, чем другие организмы. К примеру, скорость составляет от ~ 0,1 до 1 мутации на геном на поколение, это в 10³-10⁴ раза быстрее, чем у бактерий и эукариот [48, 49]. Начиная с открытия PVY в 1930-х годах [50] было описано много групп и вариантов штаммов, хотя консенсус по согласованной международной номенклатуре все еще остается предметом дискуссий. Задача фитопатологов, изучающих PVY на практике, заключается в оценке влияния изолятов PVY на урожайность картофеля. Ключевым моментом является установление биологического значения генома PVY, возникающего из новых, разнообразных популяций PVY. Характеристика и классификация PVY по группам штаммов основана на их патогенности, на симптомах растений-хозяев; однако и это часто менее изучено, так как обнаружение и идентификация изолятов PVY проводится с помощью серологических (ELISA) или молекулярных (на основе ПЦР и секвенирования) анализов. Поэтому при классификации PVY зачастую упускают проведение биологической характеристики (описание симптомов, таких, реакция сверхчувствительности, кольцевой некроз клубней и накопление PVY в инокулированных и верхних неинокулированных листьях). Это может привести к неправильной интерпретации и ошибочному включению изолята в ту или

иную группу штаммов. Серологическая характеристика изолятов PVY широко используется для классификации PVY на серотипы. Однако однозначное заключение о серотипе изолята может быть затруднено из-за разнообразия поликлональных и моноклональных антител с различными характеристиками родства, а иногда и отсутствием полностью подтвержденных данных. Наконец, хотя секвенирование генома дает точную информацию о геномной структуре изолята и, в настоящее время, является первым шагом по изучению филогении новых изолятов и их принадлежности к генотипической группе, для определения PVY к определенной группе штаммов, также требуется биологическая характеристика. Географическое распространение и рекомбинация штаммов PVY по-прежнему представляет угрозу для пасленовых культур во всем мире.

1.2.2.1 Биологическая характеристика изолятов PVY

Эффективная характеристика была достигнута путем оценки симптомов, вызываемых изолятом у *Nicotiana tabacum*, а также способности преодолевать гены устойчивости у *Solanum tuberosum* и индуцировать некроз клубней картофеля. Эти три основных критерия позволили в настоящий момент дифференцировать изоляты PVY картофеля на семь групп штаммов (PVY^O и PVY^C, PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^{N-Wi}, PVY^Z и PVY^E) [51, 52].

Изоляты групп штаммов PVY^O и PVY^C вызывают сходные мозаичные симптомы на листьях табака, однако проявление симптомов у картофеля различаются [53, 54]. PVY^C вызывает легкие симптомы полосчатости на листьях и стеблях чувствительных сортов картофеля, а также сверхчувствительность (HR) у сортов, несущих ген *Nc-tbr* (например, cvs King Edward, Duke of York / Eersteling и Maris Piper) [53, p. 164; 55]. PVY^O вызывает более серьезные симптомы, такие как некроз, морщинистость листьев, задержка роста у растений картофеля. PVY^O преодолевает ген устойчивости к *Nc-tbr*, вызывает гиперчувствительный ответ у сортов, несущих ген *Ny-tbr* [56], гены *Ny-1* и *Ny-2* [57]. Совсем недавно в группе штаммов PVY^O было обнаружено, что некоторые североамериканский изолят, обозначенный как PVY^{O-05}, индуцируют у сортов картофеля Désirée и Maris Bard ответ HR, аналогично PVY^O, но симптомы проявляются более рано с более тяжелыми некротическими поражениями [58]. Несмотря на эти различия в проявлении симптомов, изолят PVY^{O-05} был классифицирован как PVY^O. Установлено, что инфицирование растений картофеля PVY^C не вызывает процесс некротизации клубней картофеля (potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD) у сортов картофеля, чувствительных к PTNRD [59]. Однако некоторые изоляты PVY^O могут вызывать PTNRD в восприимчивых сортах Nadine и Yukon Gold, выращенных в контролируемых условиях [60].

Изоляты группы штаммов PVY^N отличаются от PVY^O и PVY^C, поскольку они вызывают некроз жилок у табака и слабые симптомы мозаики у большинства сортов картофеля. PVY^N способен преодолевать гены устойчивости *Ny-tbr*, *Nc-tbr* и *Nz-tbr*. Однако PVY^N индуцирует HR у сортов

Rywal и Romula, которые несут гены *Ny-1* и *Ny-2* соответственно [56, p. 95; 57, p. 268; 61]. В полевых условиях заражение растений картофеля PVY^N обычно не вызывает PTNRD в клубнях, но в контролируемых условиях могут индуцировать PTNRD [62].

Штамм PVY^{NTN} фенотипически тесно связан с PVY^N. Как и PVY^N, изоляты PVY^{NTN} индуцируют некрозы жилок у табака, преодолевают гены устойчивости к *Ny-tbr* и *Nc-tbr* у картофеля и запускают HR у сортов Rywal и Romula, несущих гены устойчивости к *Ny-1* и *Ny-2* соответственно. Однако изоляты, такие как PVY^{NTN-NZ}, могут также преодолевать эти гены устойчивости [63], как и изоляты PVY^N. Основным отличительным признаком, который определяет изоляты группы штаммов PVY^{NTN}, является их способность индуцировать PTNRD у восприимчивых сортов, таких как Béa, Nadine и Yukon Gold. В настоящее время PVY^{NTN} является гетерогенной группой штаммов, в отличие от PVY^N, некоторые изоляты PVY^{NTN}, такие как PVY^{NTN-H}, PVY^{NTN-NIB}, 423.3, N4 [63, p. 1053] и PVY-AST [64] вызывают реакцию HR у сортов Maris Bard и Pentland Ivory, несущие гены устойчивости *Ny-tbr*, *Nc-tbr* и *Nz-tbr* [65]. Склонность изолятов PVY вызывать PTNRD может быть оценена либо в «естественных» (то есть выращенных в полевых условиях), либо в контролируемых условиях (например, в теплице), которые более способствуют возникновению PTNRD [66]. Важно отметить, что развитие симптомов PTNRD зависит от условий окружающей среды. Действительно, инокуляция растений трех сортов картофеля изолятами PVY, принадлежащими к различным группам штаммов, привела к значительным различиям в тяжести проявления PTNRD даже в контролируемой среде [67]. Рекомендуется использование контролей. В дополнение к восприимчивым сортам, рекомендуется использовать устойчивые к PTNRD, такие как Maris Piper, Sprunta, Thalassa, Stella, BF15, но восприимчивые к инфекции PVY [68]. Такой подход позволяет получить более обширную информацию о патогенности изолятов PVY и выявить те, которые представляют более высокий риск для производства картофеля.

Изоляты штамма PVY^{N-Wi} вызывают симптомы, схожие с PVY^N на *N. tabacum* и *S. tuberosum*. Однако изоляты этой группы, вызывают отличные от PVY^N реакции у менее часто используемого индикаторного растения *Solanum brachycarpum*. Изоляты из Европы, названные PVY^{N-Wi}, вызывают мозаичные и некротические пятна, как и изоляты PVY^O. А, изоляты, родом из Северной Америки (Манитоба, Канада), названные PVY^{N:O} и вызывают некрозы жилок, приводящие к гибели растений, как и изоляты PVY^N [69]. Кроме того, некоторые изоляты PVY^{N:O} вызывают округлые, впалые некротические поражения на поверхности клубней сорта Yukon Gold, Alturas и Caribe. Эти симптомы считаются «нетипичными» PTNRD [70, 71]. В текущей классификации одна и та же аббревиатура PVY^{N-Wi} используется для определения различных подгрупп в этой группе штаммов, а именно PVY^{N-Wilga} и PVY^{N:O} [51, p. 5]. Дифференциация изолятов групп штаммов PVY^{N-Wi}, PVY^N и PVY^{NTN} основана на их различиях молекулярной структуре.

Были описаны две более редкие группы штаммов, PVY^Z и PVY^E [56, p. 100; 63, p. 1055]. Изоляты группы штаммов PVY^Z, примером которых является изолят L26, вызывают на инокулированных растениях картофеля те же симптомы, что и некоторые изоляты PVY^{NTN}. Они преодолевают гены устойчивости *Ny-tbr* и *Nc-tbr*, вызывая HR-реакцию у cv. Maris Bard и PTNRD в клубнях [63, p. 1056]. Однако, эти изоляты отличаются от PVY^{NTN}, вызывая мозаику на листьях табака, как изоляты PVY^O. В группу штаммов PVY^E в настоящее время входит только бразильский изолят PVY-MON [64, p. 388]. Этот изолят вызывает такие же симптомы, что и изоляты группы штаммов PVY^Z, за исключением способности преодолевать ген *Nz-tbr* HR. Также предполагается, что сирийский изолят PVY-12 относится к группе штаммов PVY^E, а не PVY^{NTN} [72] на основе выявленных симптомов (мозаика на табаке, PTNRD, отсутствие реакции сверхчувствительности) аналогичным изоляту PVY-MON.

До настоящего времени несколько выявленных изолятов PVY демонстрируют различные биологические характеристики, которые не попадают в ранее определенные группы штаммов. PVY изоляты AST, H, NIB и 423.3, по-видимому, составляют другую группу штаммов, из-за их биологических характеристик. Эти изоляты вызывают некрозы жилок у табака и реакцию HR на растениях картофеля сорта Maris Bard [63, p. 1057; 64, p. 389]. По мере накопления дополнительных сведений и характеристики новых изолятов PVY следует ожидать формирования новой группы штаммов вируса с отличными от существующих биологическими характеристиками.

1.2.2.2 Серологическая характеристика изолятов PVY

Антигенные свойства групп штаммов PVY являются очень важной частью их классификации, дополняющей биологическую характеристику. Первоначально антитела, вырабатываемые против вирусных частиц PVY для выявления вирусных инфекций, были поликлональными, но в начале 1980-х годов были разработаны моноклональные антитела (MAbs) в качестве предпочтительного метода для идентификации и характеристики изолятов PVY. MAbs доказали, что PVY на самом деле состоит из нескольких штаммов, которые различаются по антигенности белка оболочки или капсидного белка (CP). CP состоит из одной гидрофобной области, соответствующей центральной части белка, и двух гидрофильных областей, N- и C-концевых областей, которые открыты на поверхности частиц. Эти последние две области соответствуют первым 31 и последним 19 аминокислотным остаткам капсидного белка соответственно и несут антигенные структуры [73]. Однако аминокислотная последовательность CP N-концевой области для изолятов PVY^O и PVY^N оказалась относительно вариабельной (78% идентичности) по сравнению с таковой для C-концевой области (96% идентичности) [74]. Было обнаружено, что N-концевая область содержит антигенные структуры для дифференциации групп штаммов. C-конец несет специфические антигенные структуры для PVY [73, p. 1498; 75-82]. Два основных серотипа, определенных

с использованием иммунологических свойств изолятов PVY: серотип N, который включает PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^Z и PVY^E, и серотип O/C – включает PVY^O, PVY^C и PVY^{N-Wi}. Со временем серотипирование большого количества изолятов PVY выявило более сложную антигенность, чем первоначально предполагалось. Сравнительное тестирование с различными моноклональными антителами, специфичными к PVY^O и PVY^N, в 1980-х и 1990-х годах показало, что в большинстве этих изолятов были обнаружены либо PVY^O, либо PVY^N, но некоторые изоляты не были идентифицированы [83, 84]. Имеются исключения, например, изоляты PVY-AGA и PVY-AST не были обнаружены PVY^N-специфическим моноклональным антителом SASA-N, но реагировали с MAb 1F5, который считается специфичным для изолятов N серотипа [64, p. 394].

В то время как серологическое тестирование является очень важным диагностическим инструментом для обнаружения PVY, имеются ограничения для идентификации и классификации PVY. Серологическая характеристика и антигенность CP не всегда коррелируют с биологической характеристикой (PVY^O/PVY^{N-Wi}; PVY^O/SASA-61). В настоящее время исследователям известно об ограничениях серологической классификации, но серотипирование остается важным инструментом для характеристики изолятов PVY. Использование антител для идентификации специфических изолятов может иногда вводить в заблуждение, как указано Карасевым и соавт. (2010) [85]. Хотя моноклональные антитела являются мощным инструментом для диагностики PVY, их эффективность в идентификации изолятов PVY должна быть проверена. Моноклональные антитела, продуцируемые в течение последних 30 лет, могут распознавать различные отдельные эпитопы, которые необязательно специфичны для конкретной группы штаммов PVY [51, p. 9]. Причиной этого являются несинонимичные нуклеотидные изменения, происходящие в результате мутационно-рекомбинационных событий, которые изменяют аминокислотный состав и, в некоторых случаях, структуру CP. Следовательно, отсутствие полной проверки любых антител (MAbs и PAbS) с контролями является ограничением для использования серотипирования для классификации PVY, поскольку некоторые изоляты PVY могут не распознаваться некоторыми MAbs [86] или могут быть ошибочно идентифицированы [85, p. 3; 87]. Таким образом, для полной характеристики изолятов PVY рекомендуется полное секвенирование генома и филогенетические исследования.

1.2.2.3 Молекулярная характеристика изолятов PVY: определение филогенетических групп и рекомбинационный анализ

В 1980-х годах впервые были разработаны молекулярные методы для секвенирования генов CP изолятов PVY, а затем целых геномов. Это включало очень трудоемкое клонирование и секвенирование коротких последовательностей ДНК. Первая полная последовательность РНК изолята PVY была описана Robaglia et al. (1989) [88]. Впоследствии развитие ОТ-ПЦР для амплификации фрагментов РНК вируса и усовершенствованных технологий секвенирования Сангера привело к секвенированию многих

изолятов PVY, например, P1, HC -Pro, CP и всего генома (около 9700 п.н.). Это привело к генетической характеристике многочисленных изолятов со всего мира. На данный момент в общедоступную базу данных GenBank внесено 256 полных и 2383 частичных последовательностей генома PVY. Сравнение полных последовательностей генома двух изолятов PVY^N (N605, Mont), одного изолята PVY^{NTN} (NZ) и двух изолятов PVY^O (O139, SASA-110) показывает, что эти три группы штаммов имеют 86% своей нуклеотидной идентичности, тогда как изоляты в пределах каждой группы штаммов имеют от 92 до 94% своей нуклеотидной идентичности. Когда этот анализ был выполнен по всему геному, была обнаружена большая вариабельность нуклеотидов в области 5'NTR и в гене P1. Идентичность нуклеотидов для изолятов PVY^O и PVY^N в этих двух областях составила 67 и 72% соответственно, по сравнению со средним значением 90% для других генов. Основываясь на данном полиморфизме, области 5'NTR и P1 первоначально использовались в качестве таксономических критериев для классификации изолятов PVY. Некоторые исследователи путем анализа нуклеотидной последовательности 5'-концевой области PVY сообщают о разделении изолятов PVY на три основные группы: не некротическая группа PVY (PVY^O, PVY^C), некротическая группа (PVY^N, PVY^{NTN}) и не картофельная PVY группа [71, с. 1056; 89-91]. Более подробные описания генома PVY были созданы путем анализа последовательностей и филогенетических исследований все большего числа нуклеотидных последовательностей PVY (полных или частичных), доступных в общедоступных базах данных. Это высветило обширную молекулярную изменчивость изолятов PVY.

До 2010 года изоляты штамма PVY^O считались относительно однородными. Серологическая идентификация изолята PVY^O (PVY^{O-05}) и PVY^N в США [85, р. 7] вызвала дальнейший интерес к изучению молекулярного разнообразия изолятов PVY^O в США [58, р. 778] и в Японии [92]. Полный анализ последовательности генома большого числа изолятов PVY^O из этих двух стран выявил высокий процент (97-99,6%) сходства (авторы не опубликованы). Дальнейший анализ генома с использованием программного обеспечения RDP3 [93] для выявления случаев рекомбинации показал, что эти изоляты PVY^O состоят из шести различных подгрупп различного происхождения [58, р. 779; 92, р. 661]. Данный анализ показывает, что PVY^O является более сложной группой штаммов, чем первоначально предполагалось.

С 2011 года в этой группе штаммов обнаружена значительная молекулярная гетерогенность. Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ 44 изолятов из Северной Америки показали, что эта группа штаммов включает три различные молекулярные структуры PVY^O-O1, PVY^O-O2 и PVY^O-O3, а также PVY^O-O5 [58, р. 780]. Подобная кластеризация была также обнаружена в японской коллекции изолятов PVY^O, помимо которых включает еще два местных изолята [92, р. 663]. На основании молекулярного анализа всего генома и изучения трех геномных участков (нуклеотиды 700/2000; 2600/5800; 6270/7500) изоляты группы штаммов PVY^O можно

разделить на шесть молекулярных структур, гомологичных между собой в среднем на 97%: O1 распространен в Великобритании, США и Японии, O2, O3 найдены и O5 распространены в США и Канаде, а O-J1 и O-J2 обнаружены только в Японии. На основании молекулярных данных можно предположить, что приведенные изоляты могут происходить из разных источников [92, p. 667]. Более того, в изолятах PVY^O и PVY^{N-Wi} (независимо от их кластеризации) сравнение нуклеотидной последовательности геномного участка PVY^O от 1 до 500 п.н. выявило идентичность, близкую к 90% между изолятами. Это свидетельствует о наличии неопознанной седьмой популяции PVY^O, которая должна быть родительским геномом изолятов PVY^{N-Wi} для этого региона [58, p. 781; 94].

Две основные генетические молекулярные подгруппы штамма PVY^N были идентифицированы путем сравнения нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа. Первая (первоначально называемая паттерном «А» или европейским изолятом PVY^N EU-PVY^N) соответствует изолятам PVY^N, таким как PVYN-605, с геномом, который не обнаруживает признаков события рекомбинации [95]. Одно исключение было отмечено Schubert et al. (2007) [96] с изолятом SCRI-N, который демонстрирует нуклеотидную последовательность PVY^O в положении 7921-8347. Вторая подгруппа (схема «В» или называемая североамериканским изолятом PVY^N NA-PVY^N) состоит из изолятов PVY^N, полученных в результате рекомбинации между изолятами PVY^N различного происхождения (изолят PVY^{N-Jg}). Анализ последовательности, основанный на области 5'NTR и P1, выявил четкое разделение между изолятами EU-PVY^N и NA-PVY^N. Сходство нуклеотидной идентичности для этих двух подгрупп для первых 2665 нуклеотидов их генома составляло только 90% [71, p. 1058; 97], но выше этого сайта рекомбинации гомология составляла около 99% для двух подгрупп. Дифференциацию подгрупп на «EU» и «NA», основанную на географическом происхождении изолятов в начале 2000-х годов, отменили, поскольку изоляты EU-PVY^N (Mont, N-Jg) были обнаружены и в США. Аналогично, изоляты PVY^N с молекулярным генотипом, почти идентичным генотипу NA-PVY^N, также были обнаружены в Европе и в Японии (например, изоляты SASA-61 и NTND6) [98]. Тем не менее, для удобства изоляты PVY^N до сих пор упоминаются в литературе как EU или NA, хотя это больше не указывает на происхождение изолятов [71, p. 1065].

Генетическое разнообразие в этой группе штаммов иллюстрируется двумя генетическими изолятами, основанными на гомологии нуклеотидной последовательности в первых 2665 нуклеотидах их генома, и встречаются в рекомбинантных и нерекомбинантных изолятах PVY^N [71, p. 1055; 97, p. 42]. Это говорит о том, что эти две популяции являются результатом разных эволюционных процессов.

Серьезные потери урожая товарных клубней картофеля, вследствие поражения PTNRD, привели к многочисленным попыткам охарактеризовать геном PVY^{NTN} для разработки специальных диагностикомов. С момента первого описания этого заболевания картофеля в Венгрии в 1984 году [99] были

секвенированы 34 частичных и 19 полных геномов изолятов этой группы штаммов. Первоначально все изоляты PVY, собранные в Европе с клубней картофеля с симптомами PTNRD были идентифицированы как рекомбинантные изоляты, содержащие геномные фрагменты PVY^O и PVY^N [94, p. 364; 100-102]. Это позволило разработать NTN-специфические методы диагностики PCR-RFLP и RT-PCR на основе полиморфизма нуклеотидов в области P1 [103-105]. На основе полного анализа последовательностей изолятов PVY^{NTN} многих регионов мира было выявлено четыре подгруппы PVY^{NTN}, возникающие в результате рекомбинационных событий между фрагментами геномов PVY^N и PVY^O [94, p.; 100, p. 1954; 101, p. 2078; 102, p. 119]. В этих четырех подгруппах основной паттерн рекомбинации состоял из трех сайтов рекомбинации (RJ2, RJ3, RJ4). Первый произошел в С-концевой части гена HC-Pro между 2414–2418 п.н., второй - в N-концевой области VPg между 5809-5837 [94, p.; 101, p. 2079], и третий в С-концевой области области кодирования CP между nt 9170–9183 [100, p. 1956; 102, p. 118]. Анализ последовательностей CP коллекции европейских изолятов PVY^{NTN} из Великобритании, Словении, Дании и Венгрии показал, что 70% этих изолятов демонстрируют этот рекомбинантный профиль [100, p. 1958; 102, p. 117]. Остальные изоляты PVY^{NTN} отличались только тем, что точка разрыва в области CP возникала между 8714 и 9144 п.н. и реже встречалась в популяциях PVY^{NTN} [100, p. 1959; 102, p. 119]. Тем не менее все эти подгруппы имеют одинаковую структуру. Секвенирование всего генома изолятов PVY, полученных из обширной выборки зараженных образцов картофеля, выявило другие рекомбинантные структуры. Вторая картина, наблюдаемая в изолятах PVY^{NTN}, состояла из четырех сайтов рекомбинации (RJ1, RJ2, RJ3, RJ4). В дополнение к контрольным точкам, наблюдаемым в областях HC-Pro, VPg и CP, четвертая была идентифицирована в области P1, расположенной в точке 499-500 п.н. [96, p. 67]. Не так давно полный анализ нуклеотидной последовательности сирийского и китайского изолятов PVY выявил дополнительные рекомбинантные паттерны в областях P1 и CP [106, 107]. До настоящего времени эти рекомбинантные структуры были идентифицированы только в изолятах из Сирии (изоляты SYR-NB-16, SYR-I, SYR-II, последний называется PVY^{NTN-NW}) и из Китая (PVY-HN2) [106, p. 1305; 107, p. 35]. Сирийские изоляты первоначально были классифицированы Chikh Ali et al. (2010) как варианты, тесно связанные с группами штаммов PVY^{NTN} и PVY^{N-Wi}, поскольку они имели сходные свойства. Изоляты реагировали на серотип O, вызывая некрозы жилок на табаке, а последние 1000 нуклеотидов их геномных областей CP-3'NTR были аналогичны сирийским изолятам PVY^{N-Wi} (99,4% гомологичны). Однако изоляты также индуцировали PTNRD на восприимчивых сортах картофеля и имели геномную структуру, сходную со структурой некоторых изолятов PVY^{NTN}.

Наряду с рекомбинантными изолятами также были описаны нерекомбинантные изоляты PVY^{NTN}. Полнометражная геномная последовательность изолята PVY, происходящего из Новой Зеландии (PVY^{NTN}-

NZ) полученного из клубня картофеля с симптомами PTNRD, выявила геном, тесно связанный (примерно на 99% гомологичный) с изолятами EU-PVY^N [95, p. 50]. Филогенетический анализ различных частей генома изолятов Tu660, RRA-1, Nicola, SASA-61 и NTNOK105 выявил наличие единственной точки разрыва, расположенной вокруг nt 2665 в области HC-Pro, которая определяла североамериканскую нуклеотидную последовательность PVY^N ниже этого рекомбинантного сайта (приблизительно 99% гомологии нуклеотидов для изолята N-Jg по сравнению с приблизительно 90% для изолята PVY^N-605) и европейской нуклеотидной последовательности PVY^N выше этой точки (приблизительно 98% гомологии для N-Jg и PVY^N-605) [96, p.; 98, p. 210; 109]. Геномная структура изолята PVY-NE11 [108], хотя и демонстрирует те же биологические свойства, что и изоляты штамма PVY^{NTN}, содержит три необычных события рекомбинации [108, p. 523].

В настоящее время идентифицированы два основных геномных изолята штамма PVY^{N-Wi} на основе рекомбинаций между PVY^O и PVY^N. Первый, представленный изолятом LW, имеет две рекомбинации, расположенные в области P1 на 499-500 п.н. и в С-концевой части гена HC-Pro в положении 2400 п.н. Данные рекомбинации одинаковы или весьма схожи с рекомбинациями, характерными для PVY^{NTN} [94, p. 365; 70, 71, 96]. В дополнение к рекомбинациям, увеличили разнообразие произошедшие мутации, к примеру изолят PVY^{N-Wi} (MAF-VOY) [64, p. 392], серологически ошибочно идентифицирован как изолят PVY^N из-за одной мутации в гене капсида в положении 8864 п.н. Второй изолят в группе штаммов PVY^{N-Wi}, ранее классифицированный как PVY^{N:O}, показал только одну точку разрыва рекомбинации, расположенную, как и ранее, в С-концевой части HC-Pro гена [94, p. 368; 96, p. 68; 110]. В дополнение к этим двум основным геномным изолятам, изолят 156var отображает четыре события рекомбинации в своем геноме, то есть два события рекомбинации в P1 и HC-Pro, третий находится в области 6K2 / VPg (между 5809-5837 п.н.) и четвертый присутствует либо в гене VPg в 6700–6720 п.н. для изолята 156var, либо в С-концевой части гена NIb в 8564–8572 п.н. для изолята 156 [96, p. 69].

Как описано ранее, молекулярные данные показали, что группа штаммов PVY^{N-Wi} состоит из двух подгрупп, в основе которых одно или два рекомбинационных события. Кроме того, также сообщалось о внутреннем разнообразии геномов [111]. Филогенетический анализ PVY-геномной области 2406–5821 п.н. коллекции рекомбинантных изолятов показал, что родительский донор PVY^O этого участка не являлся одинаковым для двух популяций. Подгруппа PVY^{N-Wi} (например, изолят LW) имеет последовательность PVY^O, близкую к PVY^{O-O2}, тогда как подгруппа PVY^{N-Wi} (например, изолят Or-1) состоит из участка O-типа неизвестного, наследственного изолята PVY^O, который отличается от шести подгрупп PVY^O, описанных ранее. Помимо этого, рекомбинантные изоляты PVY^{NTN}, которые также имеют последовательность O-типа в том же участке, тесно связаны с подгруппой PVY^{N-Wi} (Or-1), что

позволяет предположить, что изоляты PVY^{N-Wi} могут быть предшественниками PVY^{NTN} [111, p. 780].

Изолят PVY-MON штамма PVY^E представляет собой геном с двумя рекомбинационными событиями (RJ2, RJ3), расположенными в тех же положениях в области HC-Pro/P3 между 2414–2418 п.н. и 6K2/VPg в области между 5809-5837 п.н., как ранее описано для PVY^{NTN}. Другой изолят PVY^E (PVY-12) имеет четыре рекомбинационных события (RJ1, RJ2, RJ3, RJ4) в тех же положениях, что и PVY^{NTN}. Несмотря на очевидную генетическую связь между PVY-12 и другими изолятами PVY^{NTN}, они различаются по своим биологическим реакциям. Несколько существующих неизвестных мутаций в другом месте в геноме PVY-12 могут объяснить эти различия, таким образом, подчеркивается чрезвычайная сложность генетических и биологических отношений.

Молекулярная характеристика была проведена только на двух изолятах штамма PVY^Z. Первый изолят PVY-M3 был идентифицирован в Мексике [112], а второй, PVY-L26, в США [63, p. 1056]. Другие изоляты были утрачены или не сохранены после завершения биологических и серологических анализов [56, p. 96; 113]. Хотя изоляты PVY^Z вызывают различные биологические реакции у сортов табака и картофеля, несущих ген устойчивости к *Nz-tbr*, по сравнению с изолятами PVY^{NTN}, они имеют идентичные геномы. Изоляты PVY-M3 и L26 несут три классических рекомбинационных события RJ2, RJ3 и RJ4 в положениях, аналогичных некоторым изолятам EU-PVY^{NTN} [112, p. 1262; 111, p. 779]. Изолят PVY-L26 был классифицирован как вариант PVY^{Z-NTN} [63, p. 1054]. Однако, предлагается избегать этой номенклатуры и выделять изоляты этого штамма как PVY^Z [63, p. 1057].

Таким образом, со времени открытия PVY в 1930-х годах было описано много групп и вариантов штаммов, хотя консенсус по согласованной международной номенклатуре все еще остается предметом дискуссий. Задача патологов растений, изучающих PVY, по-прежнему заключается в том, чтобы установить биологическое значение геномного разнообразия PVY, обусловленного новыми, разнообразными популяциями PVY, и того, как оно влияет на производство сельскохозяйственных культур. Распределение и диапазон штаммов PVY, выявленных за прошедшие годы, подчеркивают постоянную угрозу, которую PVY представляет для пасленовых культур во всем мире. Хотя секвенирование генома дает точную информацию о геномной структуре изолята и стало методом выбора в качестве первого шага к изучению филогении новых изолятов и их принадлежности к генотипической группе, это не является достаточным критерием для определения изолята PVY в конкретную группу штаммов, поскольку идентификация происходит по определенному набору реакций или симптомов, которые развиваются после заражения целым рядом сортов картофеля, несущих известные гены устойчивости, и на растениях табака.

1.3 Устойчивость картофеля к PVY

В процессе эволюции между растением и вредным организмом сложились определенные взаимоотношения, в результате которых растение или погибает, или приобретает способность противостоять паразиту (иммунитет) [114]. Устойчивость растений к возбудителю обусловлена комплексным действием различных факторов. Механизмы или факторы устойчивости подразделяют на две группы: факторы, действующие до заражения (прединфекционные); и факторы, действующие после заражения (постинфекционные). Прединфекционные факторы устойчивости присутствуют в растении независимо от поражения, а постинфекционные – индуцируются вредным организмом (например, изменение активности генов) [114, с. 17; 115]. К примеру, случаи, когда растение не является хозяином для данного вида патогена (вируса) Н.И. Вавиловым названы видовым иммунитетом, сейчас такую устойчивость называют неспецифической [116]. В 2005 году Гавриленко Т.А. и др. собрали и выделили следующие типы специфической устойчивости растений картофеля к вирусам: 1) крайняя, или экстремальная, устойчивость, при которой репликация вирусного генома поддается на ранних стадиях заражения и не проявляются никаких симптомов после вирусной инокуляции либо образуются точечные некрозы на листьях, вирус не выявляется методом ИФА; 2) сверхчувствительность – пример активного иммунитета, отмирание окружающих тканей ведет к голоданию биотрофов, а затем и к их гибели, при этом скорость и интенсивность реакции сверхчувствительности неодинакова: чем устойчивее сорт, тем быстрее развивается СВЧ; 3) полевая устойчивость, обуславливает предельно низкую вероятность инфицирования вирусами в естественных условиях; 4) устойчивость к вирусной аккумуляции (низкая концентрация вируса в растении); 5) толерантность, или выносливость, при котором симптомы заражения внешне не проявляются при наличии высокого титра вирусной инфекции [117-121].

Существование у растений приобретённого иммунитета, как у теплокровных животных и человека, до недавнего времени ставилось под сомнение, однако в настоящее время наличие его уже точно установлено. В зависимости от причин, вызвавших приобретённый иммунитет, его разделяют на инфекционный и неинфекционный. Индукторы приобретённого иммунитета делят на биотические и абиотические. К первым относят грибы, бактерии, вирусы или продуцируемые ими метаболиты, ко вторым – химические вещества (биорегуляторы) или их смеси и физические воздействия (например, облучения, температуры, магнитного поля, ультразвук и т.д.). Индуцирование биотическими средствами проводят путем инокуляции (иммунизации) авирулентными (непатогенными) расами, инактивированными патогенами и продуктами их метаболизма. Этот прием получил название перекрестной защиты или интерференции [114, с. 33].

Как известно, в основе полевой устойчивости лежат анатомоморфологические и онтогенетические особенности растений, а истинная устойчивость

обусловлена накоплением токсических для паразита продуктов. Например, у многих растений (дурмана, табака и др.) обнаружены белки, ингибирующие вирусную инфекцию, их разделяют на две большие группы: эндогенные, присутствующие в клетках независимо от заражения, и индуцированные. Эндогенные ингибируют ранние фазы вирусной инфекции путем агрегации ингибиторного белка с вирионом и подавления репликации вирусных белков вследствие инактивации рибосом. Индуцированные антивирусные белки ингибируют репликацию вирусов. Некоторые из них имеют много общего с интерферонами человека (интерфероны ингибируют репликацию некоторых вирусов растений). Большинство антивирусных белков синтезируется в растении в очень низких концентрациях, что затрудняет их исследование [114, с. 53].

Кроме вышеизложенного, устойчивость к каждому патогену у растений находится под собственным генетическим контролем, из чего исходит наличие огромного числа генов, связанных с устойчивостью к заболеваниям. Однако, история фитопатологии свидетельствует о том, что устойчивость у некоторых сортов со временем ослабевает вследствие накопления вирулентных рас. А некоторые сорта, наоборот, сохраняют свою устойчивость неопределенно долго (их устойчивость стабильна). Известный фитопатолог Вандерпланк назвал такую устойчивость горизонтальной, а устойчивость, которая может преодолеваться вирулентными расами патогенов, – вертикальной [122].

Новые штаммы вируса могут бессимптомно заражать некоторые сорта растений картофеля, что делает невозможной выбраковку зараженных клонов в поле и увеличивает общее давление инфекции PVY на посадки картофеля [52, р. 574; 123, 124].

В Республике Казахстан устойчивость сортов картофеля оценивают визуально в полевых посадках, что подразумевает долю субъективизма в результатах анализа. К примеру, в Казахском научно-исследовательском институте картофелеводства и овощеводства (с. Кайнар) устойчивость растений картофеля к вирусным болезням оценивалось согласно методике Валовик визуально по 9 бальной шкале: 1 балл – поражено 81-100% растений; 2 балла – 71-80%; 3 балла – 61-70%; 4 балла – 51-60%; 5 баллов – 41-50%; 6 баллов – 31-40%; 7 баллов – 21-30%; 8 баллов – 11-20% и 9 баллов – 0-10%. Образцы, у которых поражение составляет 1-3 балла, относятся к группе неустойчивых, 4-5 баллов – к слабо устойчивых, 6-7 баллов – к среднеустойчивых, 8-9 баллов – к высоко устойчивых [125, 126]. Согласно результатам оценки рекомендуются в качестве исходного материала для селекции картофеля следующие сорта с полевой устойчивостью к вирусам: Акколь, Аксор, Алатау, Alwara, Арал, Арника, Архидея, Астана, Аул, Балобай, Барон, Барс, Bellarosa, Berber, Беркут, Бирлик, Бриз, Валентина, Valisa, Виза, Victoria, Голубизна, Гранит, Дельфин, Дина, Дуняша, Донцовский, Елена, Estrella, Жанайсан, Жолбарыс, Жуалы, Журавника, Impala, Innovator, Ирбитский, Камераз, Каменский, Карасайский, Cosmos, Кузнечанка, Ладожский, Лазер, Ласунок, Latona, Лилея, Любава, Максим, Мария, Мошняковский, Накра, Нартау, Наяда, Невский, Никитка,

НурАлем, Нэрли, Отрада, Picasso, Памяти Боброва, Raia, Red star, Rikea, Rosara, Roка, Росинка, Русский сувенир, Sante, Скарб, София, Союз, Спиридон, Стрелец, Тамыр, Текес, Тениз, Тобол, Тохтар, Тулеевский, Тянь–Шаньский, Удача, Улан, Уладар, Утенок, Чародей, Шагала, Шортандинский, Явар; гибриды – А3360, А3401, №5, №7, 8ж, 13ж, №57, №75, №99, 95-29-1, 95-3-1, 133-02, №136, №267, №275, №281, №288, С1Р2, С1Р-5, С1Р6, С1Р7, С1Р8, С1Р9, С1Р11, С1Р12, С1Р13, 0-98-3, 2-02-13, 2-99- 2, 3-01-5, 3-99-5, 5-98-3, 6-02-15, 6-98-3, 7-02-12, 7-94-0, 7-98-2, 7-98-12, 8- 02-5, 8-04-9, 8-98-5, 9-86-2, 10-01-4, 10-02-02, 10-86-2, 27-9-9, 99-9-1 [126, с. 109].

Таким образом, выведение устойчивых к PVY сортов картофеля несомненно является важной задачей. Селекция картофеля - это процесс, динамически модифицируемый применением передовых молекулярных инструментов, упрощающих процессы отбора и выбора исходных форм. В нашей стране контроль устойчивости сортов картофеля к вирусной инфекции осуществляется лишь на визуальной оценке, селекционная значимость районированных сортов в этой связи не изучена с молекулярно-генетической точки зрения, необходимой для дальнейших исследований в области геномики и прогрессивной селекции картофеля.

1.3.1 Гены устойчивости к PVY

Устойчивость развивается только в том случае, если комплементарные гены хозяина и паразита находятся в доминантном состоянии. Если же один из них или оба гена рецессивны, то растение восприимчиво, а паразит вирулентен (состояние совместимости). Эта концепция устойчивости к вирусам называется «ген-на-ген», предложенная Х. Флором [127]. С молекулярной точки зрения наиболее изученными являются СВЧ и экстремальный типы устойчивости, которые контролируются доминантными аллелями соответствующих генов [121, с. 646]. У видов рода *Solanum* существует два основных типа одиночных доминантных генов, экстремальная устойчивость контролируется R-генами, а устойчивость по типу реакции СВЧ – доминантными N-генами [55, р. 320]. Действие R-генов считается более стабильным и передает устойчивость против всех штаммов PVY, включая ординарный, некротический и кольцевого некроза клубней [128]. Наличие данного гена приводит к ограниченному некрозу на тканях растения или же полному отсутствию симптомов. В случае наличия у сортов картофеля устойчивого генотипа, то при инфицировании PVY чувствительными методами можно обнаружить только очень низкий титр вируса. Напротив, проявление СВЧ зависит от условий окружающей среды и физиологического состояния растений [117, р. 9; 120, р. 11; 121, с. 646]. N-гены также штаммоспецифичны и обеспечивают сверхчувствительную ответную реакцию растения, предотвращая дальнейшее распространение инфекции за счет запрограммированной реакции гибели клеток (некроза) в месте инокуляции [129].

Гены устойчивости обозначают тремя буквенными символами, которые отражают: 1) контролируемый ими тип устойчивости (R или N); 2) название

вируса (*Ry* или *Ny*); 3) сокращенное латинское название вида рода *Solanum* L. – источника данного гена (*Ry-sto* полученный из *S. stoloniferum*) [121, с. 647].

Относительная устойчивость к PVY отмечена у многих сортов и генетически охарактеризована в популяциях *S. phureja* *S. stenotomum* [130]. Крайняя устойчивость к PVY обнаружена у *S. stoloniferum* [131, 132] и *S. tuberosum* ssp. *andigena* [133, 134]. Оба источника устойчивости имеют моногенный доминантный контроль наследования (*Ry-sto* и *Ry-adg* соответственно). Некартированный ген *Ny*, характеризующийся некротической реакцией, расщепляется независимо от *Ry-adg*. Когда *Ry-adg* и *Ny* присутствуют вместе, фенотип иммунен [135]. Практически все селекционные клоны и линии, включающие в себя источник устойчивости к *S. stoloniferum*, обладают мужской стерильностью (предположительно цитоплазматическая мужская стерильность). Оба гена *Ry-sto* и *Ry-adg* картированы в идентичных локусах хромосомы 11 [136, 137]. Данный иммунитет обусловлен тесно связанными, но разными генами в обоих источниках [138, 139]. Эта область хромосомы 11 имеет также последовательности ДНК, обнаруженные ПЦР, гомологичные последовательностям *N*-гена табака [140], и киназная активность присутствует в других клонированных генах устойчивости [141]. Четыре *N*-генов устойчивости, а именно *Ny-chc*, *Ny-dms*, *Nc-tbr* и *Ny-adg*, ответственные за сверхчувствительность к PVY, обнаружены у *S. chacoense*, *S. demissum*, *S. tuberosum* Gr. *chilotanum* и *S. tuberosum* Gr. *andigenum* соответственно [55, p. 7; 120, p. 6]. Два новых гена *Ny-tbr* и *Ny-1* были идентифицированы в *S. tuberosum* Gr. *chilotanum* от Celebi-Toprak et al. (2002) [142] и Szajko et al. (2008) [61, p. 299], соответственно. Ген *Ny-adg*, контролирующий СВЧ для PVY⁰, эпистатичен для *Ry-adg*. В результате генотипы, несущие как *Ry-adg*, так и *Ny-adg*, проявляли экстремальную устойчивость к PVY, аналогично устойчивости, присущей только *Ry-adg*, тогда как генотипы, несущие только *Ny-adg*, развивали некротические симптомы [120, p. 5].

Дополнительно при исследовании диких видов картофеля определены множество других генов устойчивости к PVY и PVA. Крайняя устойчивость к PVY и PVA, контролируемая моногенно, была обнаружена у *S. hougassii* (*Ry-hou*). Сверхчувствительность к обоим вирусам, контролируемая моногенно доминантно, обнаружена у *S. chacoense*, *S. microdontum* (*Ny-chc*) и *S. demissum* (*Ny-dms*) [55, p. 310].

Реакции СВЧ предшествует распознавание растением картофеля специфических сигнальных молекул вируса, называемых элиситорами (с английского to elicit – выявлять). Синтез специфических элиситоров контролируется генами авирулентности (*Avr*-ген), а *R*-гены устойчивости контролируют синтез специфического белка-рецептора. Их взаимодействие приводит к индукции защитных реакций. Если у растения отсутствует рецептор или у паразита элиситор, то защитная реакция не развивается. Отсутствие рецепции может быть вызвано делецией генов хозяина и паразита (рецептора или элиситора нет вообще) или мутациями этих генов (взаимодействие элиситор-рецептор ослаблено или потеряно) [114, с. 70]. У вирусов роль

элиситоров выполняют вирусные белки, которые синтезируются внутри зараженных клеток растений. Вирусспецифические белки – это белок вирусной оболочки (кодируют гены *CP* вирусного генома), вирусная репликаза (РНК-зависимая РНК-полимераза) и транспортный белок. В онтогенезе белок оболочки нужен для внедрения вирусов во флоэму и дальнейшему распространению по растению. Транспортный белок необходим для проходимости вирусов через плазмодесмы растительной клетки [143]. Гены устойчивости растений обычно кодируют рецепторы к элиситорам или же отвечают за передачу сигнала от рецептора к ядру клетки. Образование комплекса элиситор-рецептор является пусковым механизмом для ряда реакций (сигнальная трансдукция), приводящих к синтезу токсичных для патогена и клетки веществ, высокие концентрации которых вызывают гибель клеток. Так происходит реакция СВЧ в виде некрозов, если же СВЧ не индуцируется, то погибает не несколько клеток, а все растение, в результате распространения вирусной инфекции [121, с. 650].

Таким образом, основными устойчивыми к PVY генотипами являются те, которые несут гены *Ry*, *Ny*, *Nc* и *Nz*. В зависимости от работы специфического элиситора защитного ответа на внедрение вируса, различают следующее, ген *Ny*, распознающий штамм PVY^O, активируется белком оболочки, а гены *Nc* и *Nz*, узнающие штаммы PVY^C и PVY^Z соответственно, активируются протеазой HC-Pro [7, р. 8]. Гены *Ry*, вызывающее экстремальную устойчивость являются наиболее эффективными в защите растений картофеля против опасных рекомбинантных штаммов PVY, нежели СВЧ. Экстремальная устойчивость, развивающаяся в ответ на вирусную инфекцию, является доминантной по отношению к СВЧ. В результате в картофеле с генотипом, несущим *Ry* и *Ny*, при инокуляции PVY проявится только экстремальная устойчивость, а СВЧ нет. Это говорит о том, что *R*-гены действуют на ранней стадии заражения и более эффективны, чем *N*-гены устойчивости к PVY [135, р. 1179; 144].

К настоящему времени клонирован и секвенирован ряд *R*-генов устойчивости [145]. Химическая структура продуктов генов вертикальной устойчивости – *R*-белков была расшифрована лишь в конце прошлого века. Эти белки содержат несколько участков (доменов). Так как белки являются полимерами аминокислот, то они заканчиваются с одной стороны карбоксильной группой (С-концевой участок), а с другой – аминогруппой (N-концевой). Самый крупный домен находится на С-конце белка. Он содержит большое число (несколько десятков) повторяющихся последовательностей аминокислот, среди которых чаще других встречается аминокислота лейцин [114, с. 650]. Гены горизонтальной устойчивости и гены вертикальной устойчивости у большинства растений не рассеяны по хромосомам, а собраны в тесно сцепленные группы (кластеры), которые называют локусами, влияющими на количественные признаки – quantitative trait loci (QTL). С развитием методов ДНК-анализа появилась возможность картировать локусы, влияющие на количественные признаки, с помощью комбинации молекулярных и фенотипически проявляющихся показателей [146]. Отбор с помощью маркеров

(МОС) является эффективным подходом для определения количественных признаков (QTL), кодируемых основными генами или локусами.

1.3.2 ДНК-маркеры

Для отечественного картофелеводства важным значением является наличие в генофонде сортов с высокой устойчивостью к патогенам. Для выведения таких устойчивых сортов картофеля безусловно требуется использовать все существующие инструменты, начиная с подбора родительских форм, доноров устойчивости, обладающими набором хозяйственно-ценных признаков, и заканчивая применением современных биотехнологических методов, таких как МОС. С помощью молекулярных маркеров можно в разы увеличить скорость поиска ценных генотипов, увеличивая выборку анализируемого материала, а также проводить параллельный скрининг на устойчивость к нескольким патогенам одновременно и отбирать формы с групповой устойчивостью [147].

Три известных *R*-гена, а именно *Ry-adg*, *Ry-sto* и *Ry-chc*, успешно картированы, благодаря чему разработаны молекулярные маркеры устойчивости к PVY. Ген *Ry-adg* был картирован с помощью маркеров RFLP (restriction fragment length polymorphism; полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) TG508, GP125, CD17 и CT168 [136, p. 195]. Маркер TG508 является ближайшим маркером на расстоянии 2,0 см к гену *Ry-adg*. Эти четыре маркера были протестированы на тетраплоидном и диплоидном картофеле и признаны подходящими для МОС *Ry-adg*. Sorri V.A. с соавторами (1999) разработали CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence – полиморфизм рестрикционных фрагментов амплифицированной ДНК) маркер ADG2/BbvI, фрагмент которого амплифицируется при 310 п.н. [141, p. 165]. Разработанный CAPS-маркер ADG2/BbvI является первым диагностическим маркером для отбора PVY-устойчивого генотипа у растений картофеля, основанный на ПЦР. Позднее Kasai et al. (2000) разработали SCAR (sequence characterized amplified region, характерная последовательность амплифицируемого участка) маркер RYSC3, основанный на различиях нуклеотидов ADG2 между устойчивыми и чувствительными линиями картофеля. SCAR-маркер RYSC3 генерирует фрагмент размером 321 п.н. только в устойчивых генотипах, несущих ген *Ry-adg* [148]. RYSC3 применяется для отбора генотипа, несущего ген *Ry-adg* к PVY в МОС картофеля [147, p. 1459; 149-153].

Ген *Ry-sto*, полученный из *S. stoloniferum*, был картирован в хромосоме XII с использованием маркеров AFLP [154]. Семь маркеров AFLP (P + GAG/M + CGT, P + GAG/M + CAT, E + ATC/M + CGC, E + ACC/M + CGC, E + AGT/M + CAT, E + ACC/M + CTC и P + GGA/M + CGA) и один SSR-маркер STM0003, соответствовали локусу хромосомы XII [149, p. 298] экстремальной устойчивости к PVY у картофеля с M45 (F: CCTAGTTCTGAGCATGTAATTC; R: TGCAGCTATTCAAAACACATAAGG). Маркер STM0003 продуцирует ПЦР-продукт размером 500 п.н. [155]. Новый маркер CAPS GP122₄₀₆ для гена *Ry-sto* был разработан для МОС картофеля [150, p. 126]. Два STS-маркера

YES3-3A и YES3-3B из AFLP маркера E + ACC/M + CTC365 для гена *Ry-sto*, разработаны Song с соавторами [154, p. 164] и были испытаны в МОС на европейских сортах картофеля.

Ген *Ry-fsto* был картирован в XII хромосоме картофеля с использованием CAPS, полученных из RFLP маркеров [156]. Были разработаны ISSR-маркеры (inter-simple sequence repeat, область генома между двумя соседними, противоположно ориентированными микросателлитами) UBC 857₉₈₀, три CAPS-маркера GP122₇₁₈ (EcoRV), GP204₈₀₀ (TaqI) и GP269₆₅₀ (DdeI) и один маркер STS (сайт с меткой последовательности) GP81₄₀₀ (Flis et al., 2005). Witek K. и соавт. (2006) использовали метод мультиплексной ПЦР для обнаружения гена *Ry-fsto* в сортах картофеля в Польше и Германии [157]. Valkonen с соавторами (2008) разработали и испытали маркеры GP122₇₁₈ (EcoRV) и GP122₅₆₄ (EcoRV) для отбора генотипа картофеля, несущего ген *Ry-fsto*. Было обнаружено, что маркер GP122₅₆₄ образует продукт в 564 п.н. после расщепления рестриктазой EcoRV. Маркер GP122₅₆₄ успешно прошел испытания для отбора генотипов картофеля с геном *Ry-fsto* [155, p. 124].

Nosaka K. и соавт. (2001) обнаружили в японском сорте картофеля cv. Konafubuki ген *Ry- chc* вызывающий экстремальный тип устойчивости к PVY [158]. Ген был картирован на периферии хромосомы IX с использованием маркеров RFLP и RAPD 38-530 (OPC-01) [159]. Предполагается, что местоположение *Ry- chc* отличается от местоположения *Ry- adg* и *Ry- sto*. Маркер RAPD 38-530, связанный с геном *Ry- chc*, является ценным для МОС картофеля.

Celebi-Toprak et al. (2002) картировали ген *Ny- tbr* в хромосоме IV картофеля между маркерами RFLP TG316 и TG208 [142, p. 673]. Szajko et al. (2008) обнаружили новый ген *Ny- I*, контролирующий СВЧ как к PVY^O, так и PVY^N. Ген *Ny- I* был картирован на коротком плече хромосомы IX картофеля с использованием маркеров SCAR и COSII. Два SCAR-маркера SC895₁₁₃₉, GP41₄₄₃ и один COSII-маркер C2_At3g16840₁₁₀₀, расщепленный с TaqI, сцеплены с *Ny- I* и интегрированы в МОС для определения устойчивости к PVY у картофеля [61, p. 298].

Таким образом, главным преимуществом описанных ДНК-маркеров является то, что с их использованием возможно проводить отбор исходных форм именно по генотипу. При необходимости идентификации в организме того или иного гена такая оценка является более точной, чем оценка по фенотипу. Использование МОС в таких случаях является менее затратной и трудоемкой, к тому же, можно применять круглогодично. В нашей стране, оценка селекционного материала, проводится по фенотипу, МОС в картофелеводстве находится только на стадии внедрения.

1.4 Методы диагностики PVY

Точная диагностика вирусов, таких как PVY, является сложной задачей из-за широкого биологического и генетического разнообразия штаммов, которые вызывают ряд симптомов и заболеваний у различных сортов картофеля и связанных с ними видов пасленовых. За последние 50 лет было

разработано множество методов обнаружения PVY. Все они основаны на использовании биологических, серологических и молекулярных свойствах вирусов. Однако в семеноводческой работе при массовом производстве безвирусного посадочного материала к существующим методам предъявляются особые требования, – они должны обладать не только высокой чувствительностью и достоверностью, но и высокой производительностью при проведении анализов [4, с. 88]. Европейская экономическая комиссия Организации Объединенных Наций (ЕЭК ООН) разработала международный стандарт на семенной картофель, который обеспечивает основу для создания гармонизированной системы сертификации качества с целью облегчения сбыта семенного картофеля во всем мире [160]. В целях защиты растений к импортному семенному картофелю может применяться нулевой допуск для определенных штаммов PVY. Поэтому использование надежных диагностических инструментов имеет важное значение для обнаружения, идентификации и, при необходимости, характеристики различных штаммов PVY, которые могут присутствовать в семенном картофеле.

Наиболее часто применяемые методы для диагностики вирусов – визуальный, растений-индикаторов (биологическое тестирование) и серологические: метод капельной агглютинации и иммуноферментный анализ, а также ПЦР-анализ. Наиболее дешевый – визуальный метод диагностики системных и локальных симптомов вирусных заболеваний, однако этот способ зависит от уровня наглядности симптомов и опыта специалиста, которые снижают его надежность. Более высокой достоверностью отличается диагностика, основанная на использовании индикаторных растений, проявляющих системные или локальные симптомы даже при низких концентрациях вируса. Серологические методы, такие как ИФА, с использованием поликлональных и особенно моноклональных антител, широко используются в большинстве диагностических лабораторий из-за их экономической эффективности и возможности их применения для большого количества образцов [4, с. 88; 5, с. 29; 19, с. 78; 161].

Следует отметить, что большинство перечисленных методов достаточно сложны и дороги, поэтому их применение возможно только на начальных этапах семеноводческого процесса – при получении исходного оздоровленного материала и контроле генбанка, поддерживаемого на искусственных питательных средах (*in vitro*). В то же время экономия на данном этапе может привести к несравнимо большим потерям на последующих стадиях. Главной целью применения всех лабораторных методов диагностики является получение качественного исходного материала, соответствующего требованиям существующих нормативных документов [4, с. 26].

1.4.1 Визуальный метод диагностики PVY

На заре вирусологии растений визуальные симптомы были основным методом регистрации заболеваний, связанных с вирусами, включая PVY. До начала 1900-х годов вирусные пороки развития растений картофеля

описывались как «мозаичные», «курчавые» и «морщинистые» заболевания [50, р. 702; 162]. Мозаичная болезнь проявляется в виде пятнистости более светлых хлоротичных участков на листочках без какой-либо. Морщинистость проявляется как мозаика вместе со сморщиванием листьев, особенно на верхушках стеблей. Когда инфекция передается из семенных клубней (вторичная передача), пораженные растения низкорослые и сильно сморщиваются. Точно так же морщинистость развивается только при вторичном заражении, когда листья становятся сильно морщинистыми, пятнистыми и тесно сбиваются вместе. Нижние листья могут полностью некротизироваться и опадать вдоль стебля [162, р. 47]. В зависимости от сорта картофеля и штамма PVY проявление некротических симптомов варьируется. Некроз может проявляться в потемнении жилок, видимых под поверхностью листа, и может сопровождаться также некрозом черешков и основного стебля. В некоторых случаях некроз на листе может образовывать узор «дубовый лист». Четко очерченные некротические круглые пятна также могут развиваться в ответ на поражение PVY. Кроме того, заражение некоторыми штаммами PVY, такими как PVY^{N-Wi}, может протекать бессимптомно или вызывать только очень легкие симптомы на растениях картофеля, поэтому такие зараженные растения нельзя обнаружить при визуальном осмотре [163].

Генотип сорта картофеля, стадия развития растения, тип инфекции (первичная или вторичная), время первичного заражения (раннее или позднее), количество изолятов/штаммов вируса, поражающих растение (одиночный или множественный) и условия окружающей среды также могут влиять на проявление растением вирусных симптомов. Визуальная диагностика поэтому недостаточно надежна для выявления инфицированных растений в культуре, но может дать направление для дальнейших анализов на детекцию вируса и определения степени заражения используя уже более чувствительные и достоверные методы.

PVY обычно заражает все части растения, включая клубни, в которых вирус может выжить до следующего вегетационного периода. Заражение некоторыми штаммами PVY может вызвать появление на клубнях картофеля некротических кольцевых пятен PTNRD. Часто они едва заметны при сборе урожая, но развиваются во время хранения. Первоначально симптомы PTNRD развиваются в основном около глазков клубня. В течение хранения в течение двух-трех месяцев симптомы PTNRD могут покрывать большую часть поверхности клубня. По мере развития симптомов некротические кольца втягиваются внутрь в результате разрушения тканей. Иногда возможно появление трещины, которые могут стать отправной точкой для заражения другими патогенами, такими как грибы и бактерии. В большинстве случаев симптомы PTNRD связаны с инфицированием изолятами штамма PVY^{NTN} [67, р. 48].

Таким образом, недостатками визуального метода диагностики вирусной инфекции – низкая специфичность положительных и неудовлетворительная достоверность отрицательных результатов. Визуальная диагностика

применяется как метод предварительной оценки зараженности материала. Результаты данного метода необходимо перепроверять и уточнять другими существующими методами диагностики.

1.4.2 Биологическое тестирование с индикаторными растениями

При индикаторной диагностике растений вирусы передаются растениям-индикаторам контактно-механическим путем, т.е. натиранием листьев соком или гомогенатом исследуемого образца [17, с. 111]. Индикаторным называют растение, которое дает реакцию на данный вирус, легко отличимую от реакции этого же вида растения на другие вирусы [14, с. 258].

По типу реакции растения-индикаторы подразделяются на растения, реагирующие на заражение местными (локальными) и системными поражениями. При местной реакции хлоротичные пятна, некрозы, концентрические узоры появляются на инокулированных растениях в течение 3-7 дней после заражения. На растениях с системной реакцией мозаика, деформация листьев, некротические поражения развиваются на отрастающих листьях и на различных органах. Растения, со смешанной реакцией вначале могут реагировать развитием симптомов на инокулированных листьях, но затем признаки заражения распространяются по всему растению [14, с. 259; 15, с. 297].

К индикаторам с местным и смешанным типом реакции на заражение PVY относятся *Chenopodium amaranticolor* и *Chenopodium guinoa*. У первого вида он вызывает красно-бурые пятна, а у второго – мелкие хлоротичные некрозы. Кроме индикаторов с местным и смешанным типами реакций применяют также индикаторы, реагирующие системно [14, с. 249]. К таким растениям относятся ряд сортов *Nicotiana tabacum* L.: White Burley; Samsun 959, Samsun 47/10 на штаммы PVY^O и PVY^C они реагируют посветлением и окаймлением жилок неинокулированных и отрастающих листьев, а на штамм PVY^N – некрозами основных жилок. Некротические поражения нередко захватывают и стебли зараженных растений. Системный тип реакции к этому вирусу выявлен также и у других представителей рода *Nicotiana*: *N. glutinosa* L., *N. sylvestris* Speg, *N. debneyi* Domin., *N. clevelandii* L., *N. alata* L., *N. digluta* L., *N. megalosiphon* L., *N. acuminata* L [14, с. 263].

В зависимости от характера симптомов проявляющихся на индикаторных растениях *C. amaranticolor* и *N. tabacum*, изоляты PVY подразделяют на две биологические группы. Изоляты PVY, вызывающие локальные поражения инокулированных листьев *C. amaranticolor* и мозаику на листьях табака, классифицируются как биотип-O PVY (штамм PVY^O). Изоляты PVY, которые не вызывают симптомов у *C. amaranticolor*, но вызывают некроз жилок на листьях табака, классифицируются как биотип-N PVY (штамм PVY^N). Как указывалось ранее, на тяжесть проявляемых симптомов влияют штамм PVY, титр вируса в растении, тип инфекции (т.е. первичная или вторичная) и внешние условия [52, р. 5; 55, р. 334; 164-166]. Эффективность индикаторной диагностики в значительной степени зависит от правильности выбора тест-

растения, условий его выращивания до и после инокуляции, способа приготовления инокулюма и методов инокуляции [17, с. 108].

Способность вызывать симптомы PTNRD на клубнях является необходимым условием для классификации штамма PVY^{NTN}, но не все изоляты, вызывающие PTNRD, являются PVY^{NTN}. Оценка PTNRD может быть проведена путем механической инокуляции листвы растения картофеля и оценки частоты и степени тяжести PTNRD на дочерних клубнях. В зависимости от агрессивности изолята симптомы могут развиваться после сбора урожая, но чаще они появляются через 1-2 месяца после хранения при 4°C [68, р. 105]. Развитие PTNRD сильно зависит от условий окружающей среды во время роста растений и хранения клубней, агрессивности изолята PVY и генетического фона сорта картофеля.

Использование индикаторных растений позволяет надежно идентифицировать изоляты PVY, однако этот метод сложно реализовать, поскольку для выращивания и содержания растений в условиях, оптимальных для проявления симптомов, требуются тепличные помещения. Инкубация в течение нескольких месяцев также необходима для проявления симптомов на листьях или клубнях картофеля. Таким образом, метод биологического тестирования с индикаторными растениями является основным инструментом для штаммовой классификации изолятов PVY, но не подходит для массовой диагностики PVY. Идентификация и характеристика изолятов PVY обычно достигается с помощью серологических методов (тестирование на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием ряда антител) и секвенирования генома (частичного или полного).

1.4.3 Иммунодиагностика PVY

Иммунодиагностика вирусов растений основана на способности иммунитета теплокровных животных [17, с. 94]. Белковый компонент многих фитопатогенных вирусов, как и все белки, и некоторые высокомолекулярные соединения, обладают антигенными свойствами, то есть способность вызывать образование в организме теплокровных животных специфических антител – белковых частиц. Последние при введении в организм белка образуют прочные агрегаты, выпадающие в осадок из коллоидного раствора. Сыворотка крови животного (кролика, лошади, морской свинки и др.), которому был введен тот или иной белок (антиген), служит диагностическим реактивом для обнаружения этого или родственного ему белка в исследуемом образце (экстракте, клеточном соке, препарате и т.д.). Метод диагностики получил название серологического от латинского слова *serum* – сыворотка [167].

Для идентификации растительных вирусов используют несколько типов серологических реакций, из них наиболее распространены реакции преципитации и агглютинации (капельный метод). Также используются методы радиальной иммунодиффузии в агаре (РАДА), двойная иммунодиффузии в агаре (ДИДА), латексагглютинация (ЛА), латекстест (ЛТ) и др. [17, с. 95]. Вскоре после открытия антигенных свойств вирусных частиц некоторые

антисыворотки против PVY были разработаны в различных институтах по всему миру и использовались в качестве серологического инструмента для обнаружения PVY с помощью реакции преципитации в жидкой среде или в анализе двойной диффузии в гели [168-170]. Трудности определения Y-вируса картофеля капельным методом связывают с низкими концентрациями вируса в растениях и низкой чувствительностью метода (100 мг/мл), что не позволяет использовать данный метод на выявление скрытой зараженности [171].

Иммуноферментный анализ. Революция в серологической диагностике произошла в конце 1970-х, когда произошли два технологических прорыва. В 1975 году Келер и Мильштейн описали получение моноклональных антител путем слияния «бессмертных» раковых клеток миеломы мыши и клеток селезенки мыши, инфицированных антигеном. В 1977 году Кларк и Адамс разработали метод ферментативной маркировки антител и их абсорбции на твердой поверхности и назвали этот новый диагностический метод ИФА (иммуноферментный анализ). Этот тест в тысячу раз более чувствителен, чем иммунодиффузионный тест, намного проще в использовании, быстр, адаптируется к крупномасштабному тестированию и позволяет автоматизировать и количественно определять целевой антиген [172]. Эти два научных достижения позволили серологическому тестированию стать мощным инструментом для обнаружения PVY. Были разработаны различные форматы ИФА, но наиболее широко используется метод двойного наслоения антител («сэндвич-вариант»), который основан на визуализации взаимодействия антиген-антитело посредством колориметрической реакции, опосредованной ферментом, таким как щелочная фосфатаза или пероксидаза хрена, конъюгированным с антителом. Принцип «сэндвич-варианта» твердофазного ИФА основан на последовательном взаимодействии тестируемого вируса с иммобилизованными на твердой фазе и мечеными ферментом антителами с последующим выявлением фермента-маркера субстратом. Оптическая плотность продукта ферментативной реакции пропорциональна концентрации определяемого вируса. Поскольку продукт ферментативной реакции имеет цветную окраску, результаты можно учитывать, как инструментально, так и визуально [173]. В качестве твердой фазы в практике наиболее часто применяют 96-луночные микроплааты из оптически прозрачного полистирола, позволяющие проводить весь цикл анализа от стадии иммобилизации до измерения ферментативной активности в каждой из лунок [174]. Чувствительность определения вирусов методом ИФА в 100-1000 раз выше чувствительности метода капельной агглютинации и составляет около 10 нг/мл сока [173, с. 7]. Оптическая плотность измеряется спектрофотометром (при 405–410, 490 нм) и может отражать количество вирусных частиц, присутствующих в образце. После того, как стала доступна технология получения моноклональных антител (MAb), многие лаборатории по всему миру начали гонку за разработку собственных моноклональных антител специфичных штаммам PVY^N и/или PVY^O: Швейцария, Шотландия, Великобритания [175], Франция [176], Япония [177], Испания [178] и США

[179]. Однако, тестирование в ИФА не всегда коррелировало с биологическим тестированием [163, p. 180]. ИФА специфически дифференцирует штаммы в пределах О-серотипа (PVY^O, PVY^{N-Wi}) или штаммы в пределах N-серотипа (PVY^N, PVY^{NTN}, PVY^Z, PVY^E). Единственная мутация одной аминокислоты в белке оболочки может привести к тому, что изолят больше не будет распознаваться МАb [86, p. 679] или будет неправильно идентифицирован [85, p. 8; 87, p. 412]. Выделение и очистку вирусных антигенов картофеля осуществляют зарубежные компании Spot Check LF, («AdgenLtd», Великобритания), Pocket Diagnostik («Forsite Diagnostiks Ltd», Великобритания), Immunostrips («Agdia», США) и др. В Российской Федерации ФГБНУ «Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха» собственные вирусные препараты применяют для получения поликлональных антител и производства коммерческих диагностических иммуноферментных наборов. В Республике Казахстан в Институте молекулярной биологии и биохимии им. А.К. Айтхожина проводятся работы по трудоемкой очистке вирусов картофеля PVX, PVY, PVS, PVM из листьев растений-накопителей, однако производство вирусных антигенов и иммуноферментных диагностикумов не поставлено на промышленную основу.

Таким образом, в Республике Казахстан отсутствует производство диагностических тестов для выявления возбудителей вирусных заболеваний картофеля.

1.4.3.1 Очистка вирусов

Качество антисыворотки зависит от концентрации и чистоты вирусного препарата, введенного в животных для стимулирования образования антител [46, с. 55]. Методы очистки основываются на физических и физико-химических различиях между вирусными частицами и другими веществами. Поскольку эти различия варьируют среди вирусов и хозяев и в соответствии с условиями, - нет универсального метода, пригодного для всех вирусов. Исследователь должен разрабатывать свои собственные методы, проверяя каждый этап очистки. Применяемый в отдельном случае метод зависит от природы вируса, хозяина, используемого для его размножения, и изучаемых свойств. На выбор метода также может влиять имеющееся в распоряжении оборудование [14, с. 158].

Прежде чем очистить вирус, его необходимо выделить из клеток хозяина. Нормальная целая клетка растений обладает плотной клеточной оболочкой, окружающей желатинообразную цитоплазму, в которой можно видеть различные включения и органеллы, в том числе хлоропласты (обычно содержащие зерна крахмала), ядро и митохондрии [180]. Обычно первая стадия очистки вирусов сводится к разрушению клеток и экстракции сока растения, в котором находится вирус. Сок представляет собой сложную смесь, содержащую различные ингредиенты клетки, в том числе ферменты, способные разрушать или инактивировать некоторые вирусы. Сок, как правило, нестабилен и имеет большие значения pH [14, с. 161]. Большинство крупных компонентов сока растений (хлоропласты, митохондрии, зерна крахмала,

фрагменты клеточной оболочки) быстро оседают, и их можно удалить кратковременным низкоскоротным центрифугированием. В соке присутствуют и низкомолекулярные вещества – сахара, соли, аминокислоты. Наконец в состав сока входят растительные белки, рибосомы, микросомы, занимающие промежуточное положение между рассмотренными выше группами. Именно они наиболее близки к вирусам по размеру, составу и стабильности и от них труднее всего освободиться при очистке [180, с. 104].

Конечная цель очистки – получить препарат, содержащий только инфекционные вирусные частицы, однако достичь этой цели почти никогда не удастся. Удаление примесей само собой представляет трудную задачу, но дело осложняется еще и тем, что зараженное растение помимо зрелых содержит и недоразвитые вирионы, т.е. частицы разного размера, состава и инфекционности, а кроме того, часть вирусных частиц при очистке теряет свою инфекционность. Иногда изменяется и морфология частиц [174, с. 19].

Для фракционирования препаратов растительных вирусов используют изопикническое центрифугирование. Плотность частиц большинства вирусов растений лежит в интервале от 1,3 до $1,45 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$, и только плотность липидосодержащих вирусов меньше (около $1,18 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$). Таким образом, в сахарозе можно проводить изопикническое разделение только липидосодержащих вирусов (плотность 60%-го раствора сахарозы при 20°C равна $1,22 \text{ г} \cdot \text{см}^{-3}$), а для изопикнического фракционирования остальных вирусов нужно использовать растворы различных солей, например хлористого цезия или молибденовокислого калия [180, с. 114]. Градиенты сахарозы или молибденовокислого калия обычно приготавливают непосредственно перед центрифугированием [181]. Для этого используют либо специальный смеситель, либо наслаивают друг на друга четыре раствора с различной плотностью, при котором выдерживаются некоторое время, чтобы границы между слоями сгладились за счет диффузии. В растворе сахарозы стабильны большинство вирусов, разделенные компоненты тем или иным способом извлекают пробирок и диализуют для удаления вещества, из которого был сформирован градиент, иногда фракции разбавляют и вновь центрифугируют для отделения вирусных частиц.

Таким образом, качество антисыворотки зависит от концентрации и чистоты вирусного препарата. Конечной целью очистки является получение препарата, содержащего только инфекционные вирусные частицы, что является весьма сложным. Методы очистки вирусов основываются на физических и физико-химических различиях между вирусными частицами и другими веществами.

1.4.3.2 Получение специфических антисывороток – основных реагентов при создании тест-систем

Антитела обнаружены во всех циркулирующих жидкостях организма иммунизированного животного, но основная их масса присутствует в сыворотке крови. При введении фитовируса в организм животного его

иммунная система реагирует на вирус как на чужеродный агент. В результате в организме происходит синтез специфических антител, который подчиняется общим иммунологическим закономерностям [182].

В 1939 году было установлено, что антитела – это сывороточные белки, основную массу белков сыворотки составляют альбумины и глобулины. Это грубое деление белков сыворотки на два класса было первоначально введено, исходя из различий их растворимости. Глобулины осаждаются полунасыщенным раствором сульфата аммония (2M), а альбумины в нем растворимы. Более современный критерий различия белков сыворотки – электрофоретическая подвижность. Антитела появляются в глобулиновой фракции сывороточных белков. Глобулины всегда имеются в сыворотке здоровых животных. Однако после иммунизации в организме животного появляются иммуноглобулины, которые отличаются от глобулинов нормальной сыворотки своей способностью специфично взаимодействовать к заданному антигену. Иммуноглобулины подразделяются на 5 классов: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, а в пределах каждого класса на подклассы, которые отличаются по структурным свойствам и функциональным значениям [174, с. 39]. После иммунизации животных фитовирусами в антисыворотках обнаружены антитела двух классов – IgM и IgG [182, с. 18; 183, 184].

Для исследования главным образом используются иммуноглобулины типа G, обозначаемые IgG, содержания которых в крови наибольшее среди рассматриваемых пяти классов [174, с. 39].

Иммуноглобулины – уникальные по своей организации сывороточные белки. Сохраняя почти одинаковую общую структуру молекулы, они в то же время отличаются необычной функциональной гетерогенностью. Можно индуцировать образование высокоспецифичных антител к огромному количеству различных химических структур как природных, так и синтезированных искусственно, таких, с которыми организм в естественных условиях никогда бы не встретился. Общим свойством иммуноглобулинов является их способность связываться с антигенами. Эта функция обусловлена наличием в молекуле антигеносвязывающих центров [174, с. 39]. Популяция антител обладает настолько высокой специфичностью, что они в состоянии распознать химические соединения, отличающиеся лишь одной функциональной группой. Антитела, полученные к одному вирусу, не будут взаимодействовать в реакции антитело-антиген с другими вирусами, если у последних нет тех же антигенных детерминант с вирусом, вызвавшим индукцию специфических антител [185].

Сыворотки, полученные при одинаковой схеме иммунизации от разных животных, особенно от разных видов, будут отличаться одна от другой [186].

Наряду с иммунологической активностью животного и характером вводимого иммуногена, на концентрацию и специфичность антител в сыворотке влияют выбор дозы иммуногена, способ введения фитовируса, количества инъекций, длительность интервалов между ними, применение адъювантов, время взятия крови и др. [174, с. 50].

Одна и та же доза иммуногена может вызвать большее количество специфических антител, если его вводить на протяжении длительного срока, разделив на несколько порций вместо однократного введения [187].

Процесс специфической перестройки организма под влиянием введенного иммуногена наступает медленно и требует определенного интервала времени. Поэтому каждое повторное раздражение будет эффективным только тогда, когда оно проводится с интервалом, соответствующим времени для завершения процесса иммунного ответа [174, с. 55].

Известный фитовирусолог Р. Метьюз пишет, что при работе с вирусами растений наиболее эффективны промежутки между инъекциями в 7 дней [187, с. 9].

При получении антисывороток с высоким уровнем специфических антител к фитовирусам рационально сокращать схему иммунизации. При работе с очищенными препаратами вирусов следует ограничить число инъекций до минимума. Слабо иммуногенные антигены следует вводить с адъювантами. Интервал между инъекциями необходимо варьировать, в зависимости от величины первой дозы. Непосредственное введение иммуногена в места, вырабатывающие антитела, при дозе не более 1 мг имеет несомненное преимущество перед другими схемами иммунизации. Разработка эффективных методов иммунизации и, как следствие этого, получения строго специфических сывороток дали в руки исследователя материал для характеристики эпитопов [174, с. 58].

Кровь берут, когда титр сывороток в крови иммунизированного животного принимает наивысшее значение. Собранную кровь, оставляют на несколько часов для свертывания при 25°С либо на два часа в термостате при 37°С. Чтобы обеспечить ретракцию сгустка, его отделяют от стенок сосуда, к которым он обычно прилипает, стеклянной палочкой. Если не сделать этого аккуратно, то часть эритроцитов будет разрушена и сыворотка окажется загрязненной гемоглобином. Не допускается также замораживание, так как гемолизованный кровь не пригодны для дальнейших исследований. Можно оставлять сыворотку после взятия крови и в холодильнике на 24-28 ч [188].

После окончания ретракции прозрачную желтоватую сыворотку осторожно отделяют, это и есть иммунная сыворотка, или антисыворотка [174, с. 51].

Иммунные сыворотки должны быть достаточно активными и специфичными и иметь высокий титр. Как правило, оценку антисывороток проводят при пробных кровопусканиях у подопытных животных. Исследования следует проводить быстро и точно, так как уровень антител, образующихся после серии последовательных инъекций, может меняться на протяжении нескольких дней. Специфичность означает то, что антитела к определенному белковому иммуногену могут реагировать только с ним и родственными по структуре белком. Моноспецифичность – основной критерий сыворотки, если она не обладает необходимой специфичностью, то не представляет никакой

ценности. Идеальная антисыворотка содержит антитела одного типа против единственной детерминанты [188, с. 4].

Титр. Активность сывороток характеризуется их титром. При наличии антисывороток, обладающих одинаковой специфичностью, конечный выбор использования их в иммунохимических реакциях зависит от титра. Титром называют такое минимальное соотношение сыворотки и буфера, при котором еще можно пронаблюдать реакцию взаимодействия антитела с антигеном. Антисыворотка должна обладать высоким титром. Высокие титры свидетельствуют о высоком содержании антител. Это позволяет использовать данную сыворотку в различных серологических реакциях в больших разведениях. Кроме того, чем выше титр антисыворотки, тем в большем разведении ее можно использовать, а это, в свою очередь, дает возможность свести до минимума проявление перекрестных реакций, обусловленных наличием других сывороточных белков. Определение титра является классическим методом оценки антисыворотки [174, с. 52].

Кроличы антисыворотки. Лабораторные кролики считаются наиболее подходящими для получения антисывороток в сравнении с другими лабораторными животными благодаря тому, что способны продуцировать высокое количество антител, например, за год исследователи можно получить 400 мл сыворотки [189].

Кроме того, кролики как лабораторные животные достаточно неприхотливые в уходе, их легко содержать, иммунизация также не вызывает затруднений и проще брать кровь. Обычно для иммунизации одним вирусом достаточно трех кроликов. Для получения специфических к антигену сывороток следует брать кроликов с массой тела не менее 2500-3000 г. Молодые кролики, имеющие массу ниже, вырабатывают антитела в меньшем количестве. Желательно, чтобы у кроликов были большие уши с хорошо выраженными венами. Для работы рекомендуется брать животных одинакового возраста с одинаковой массой тела и одного пола [174, с. 54].

Большие объемы антисыворотки получают, используя в качестве лабораторных животных коз, овец, лошадей, но их титр сравнительно невысокий [190, 191]. Лошадей и других крупных животных можно использовать в качестве донора антисывороток в течении нескольких лет [174, с. 55].

Таким образом, из литературных источников известно, что при введении микроорганизмов или их токсинов в организм теплокровного животного в сыворотке крови появляются защитные вещества, получившие название антител. Иммуноглобулины – уникальные по своей организации сывороточные белки. После иммунизации вирусным иммуногеном, в организме животного появляются иммуноглобулины, которым характерна способность специфично вступать в реакцию с антигеном. На концентрацию и специфичность антител в сыворотке влияют выбор дозы иммуногена, способ введения фитовируса, количество инъекций, длительность интервалов между ними, применение адъювантов, время взятия крови и др. Поликлональные сыворотки должны

быть достаточно активными, специфичными и иметь высокий титр. Несмотря на такие преимущества, как гомогенность и высокая специфичность моноклональных антител, поликлональные антисыворотки продолжают находить широкое применение в ученых кругах, благодаря доступности и простоте их получения, и являются альтернативой рутинной технологии производства моноклональных антител.

Таким образом, в настоящий момент для диагностики РVУ в ИФА, особенно в схемах сертификации, используются как поликлональные, так и моноклональные антитела, однако поликлональные антитела отличаются простотой получения и доступностью. Метод ИФА наиболее актуален для диагностики и обнаружения РVУ из-за его надежности, практичности, низкой стоимости внедрения и эксплуатации, а также доступности для каждой лаборатории.

Технология Luminex xMAP. К новым методам можно отнести вариант гибридного ИФА [192] при проведении которого происходит сокращение продолжительности выполнения анализа, а также технологию Luminex xMAP при которой происходит одновременное исследование образца на несколько антигенов [193]. Технология xMAP - относительно новый метод, сочетающий взаимодействие антигена и антитела, как в ELISA, и проточный цитометр. В нем используются магнитные или полистирольные микросферы с разными внутренними соотношениями для двух флуорохромов, что делает их уникальными. В настоящее время коммерчески доступно 500 различных наборов гранул. Каждая гранула покрыта моноклональным антителом, специфичным к антигену, инкубируется с тестовым образцом, к которому добавлены вторичные антитела, конъюгированные с репортерным флуорохромом. Гранулы в суспензии извлекаются, индивидуально разделяются и анализируются анализатором Luminex с двумя источниками света; первый возбуждает внутренние красители микросфер, а второй возбуждает репортерный флуорохром, конъюгированный со вторичными антителами [194].

Результаты первоначальных экспериментов продемонстрировали надежность этой технологии для обнаружения нескольких антигенов в мультиплексе, но имелся недостаток, напрямую связанный с этим свойством, заключающийся в увеличении времени, в течение которого анализатор Luminex обрабатывал образцы, пропорционально количеству различных антигенов и гранул присутствующих в анализе.

Метод иммунохроматографического анализа (ИХА). В последние годы широкое применение находит диагностика вирусов растений, осуществляемая с помощью метода иммунохроматографического анализа, которая проводится за короткий промежуток времени при комнатной температуре [195]. Метод ИХА в первую очередь предназначен для применения в полевых условиях. Весь анализ протекает за 20-30 минут, а для его выполнения специалисту не требуется иметь специализированного образования в области лабораторной диагностики. В этой технологии используются специфические моноклональные или поликлональные антитела, вырабатываемые против антигена,

иммобилизованного на мембране, прикрепленной к двум устройствам: индикаторной полоске или пластиковой кассете. В случае применения тест-полоски ее конец погружается в образец сока растений, тогда как у пластиковой кассеты несколько капель сока наносят на определенную область. Сок мигрирует вверх по мембране за счет капиллярных сил и достигает области, где целевой антиген захватывается специфичными антителами. Если интересующий антиген присутствует в образце, инициируется реакция между антигеном и антителом. Этот комплекс накапливается и образует видимую полосу, указывающую на присутствие вируса в образце. В Великобритании и США эта технология использовалась инспекторами семенного картофеля и даже производителями в качестве предварительного теста для подтверждения визуальной диагностики растений картофеля. Однако в Великобритании органы по сертификации семенного картофеля требуют подтверждающего анализа зараженных вирусом растений с помощью ИФА. В 2010 году исследовательская группа из США провела исследование по оценке надежности полевых диагностических ИХА-наборов [196]. Было проанализировано 115 образцов с симптомами PVY на листьях и без и сравнены с результатами, полученными с помощью обычных методов ИФА и ОТ-ПЦР. Расхождения в основном были представлены ложноотрицательными результатами. Таким образом, данные демонстрируют, что технология ИХА может быть достоверной только при достаточно высоких концентрациях вируса в анализируемой пробе.

1.4.4 Молекулярно-генетические методы диагностики PVY

Как и в случае с методом ИФА, важная веха в обнаружении нуклеиновых кислот произошла, когда в 1980-х годах была разработана технология полимеразной цепной реакции (ПЦР) [197], позволившая получить доступ к генетической информации о микроорганизмах. Этот молекулярный инструмент позволяет быстро и надежно амплифицировать целевые ДНК с чувствительностью, в 103 раза большей, чем ИФА. Метод ПЦР стали использовать во всем мире для диагностики PVY. Вначале ОТ-ПЦР начали применять для диагностики PVY в покоящихся клубнях картофеля и тлях, что было ранее невозможно с помощью ИФА [198, 199]. Однако теперь метод используется в основном для идентификации новых штаммов и рекомбинантов PVY, которые появляются во многих странах. Хотя биологическое тестирование и серологические методы предоставили средства для определения штаммов PVY, в настоящее время требуются более чувствительные методы для выявления различий внутри штаммов и сложных рекомбинантов PVY. Например, штамм PVY^{NTN} невозможно отличить от PVY^N с использованием МАb или индикаторных растений табака, поскольку они имеют одинаковый серотип и фенотипическую экспрессию в табаке. Для решения этой проблемы разработали анализ ОТ-ПЦР, который основывался на определении нуклеотидного полиморфизма частей генома, таких как цистрон P1 [97, p. 42; 105, p. 59; 200, 201], или одиночного нуклеотидного полиморфизма в области

CP [202]. Позже выяснилось, что метод являлся надежным только для узкого числа изолятов и несовместим при тестировании широкого диапазона изолятов PVY^{NTN}. Последующее значительное улучшение идентификации штаммов PVY было обусловлено двумя основными факторами: во-первых, увеличение последовательностей PVY, доступных в базах данных ДНК, что позволило создать специфические и надежные праймеры; во-вторых, разработка и использование специальных программ анализа последовательностей, которые привели к открытию рекомбинантной природы геномов PVY^{NTN} и PVY^{N-Wi} [94, p. 374; 101, p. 2085], а также к идентификации большинства недавно охарактеризованных рекомбинантных изолятов PVY в посевах картофеля во многих странах [63, p. 1053; 64, p. 389; 71, p. 1056; 98, p. 199; 107, p. 32; 108, p. 518]. Например, большинство изолятов PVY^{NTN} имели три общих рекомбинационных перехода (RJ) – RJ2, RJ3 и RJ4, тогда как изоляты PVY^{N-Wi} имели либо один RJ (RJ1), либо два RJ (RJ1 и RJ2). ОТ-ПЦР с различной специфичностью в отношении количества RJ на каждый анализ, и нуклеотидного полиморфизма, фланкирующего эти RJ, привели к характеристике новых вариантов PVY и их дифференциации на группы штаммов [102, p. 117; 91, p. 39; 203; 96, p. 66; 204].

Для одновременного обнаружения нескольких вирусов картофеля в одной исследуемой пробе создана система мультиплексной ОТ-ПЦР, основанная на участии в реакции нескольких пар праймеров [205]. Кроме того, система мультиплексной ОТ-ПЦР используется для идентификации штаммового состава PVY [106, p. 1303; 107, p. 31]. Мультиплексный анализ разработан для охвата большей части генома и нацеливания на пять рекомбинационных перехода, то есть RJ1, RJ1a, RJ2, RJ3 и RJ3a, что позволило дифференцировать дополнительные штаммы и варианты PVY, встречающиеся по отдельности или в комбинации [107, p. 38; 206]. Модификация анализа ОТ-ПЦР с использованием иммунозахвата (IC) для обхода необходимости выделения РНК увеличила его специфичность [106, p. 1304] и сделала его более подходящим для масштабного тестирования [206, p. 1157].

Для диагностики PVY применяются современные высокочувствительные подходы проведения амплификационного тестирования: ПЦР «в реальном времени» (Real-time PCR) [207] и метод флуоресцентного определения продуктов реакции по конечной точке (Flach-PCR) [208]. В данных методах для проведения детектирования результатов не требуется открывания пробирок с реакционной смесью, в связи с чем, ликвидирована возможность контаминации ДНК-амплификонами.

ПЦР не является единственным методом амплификации нуклеиновых кислот. Разработан альтернативный метод репликационного синтеза – так называемая изотермическая трехферментная амплификация (NASBA). В качестве определяемой мишени может использоваться только одноцепочечная РНК. Процесс катализируется тремя ферментами – обратной транскриптазой, РНКазой H и РНК-полимеразой фага T7. Реакция осуществляется при постоянной температуре в термостате (37-42°C). Процесс начинается с

присоединения праймера имеющего сайт с промотром для полимеразы T7. Обратная транскриптаза синтезирует цепь кДНК, РНКазы N удаляет образовавшуюся двухцепочечную структуру (кДНК). На кДНК освобождается место для гибридизации со вторым праймером, который достраивается обратной транскриптазой. РНК полимеразы T7 узнает свой промотор и синтезирует несколько сотен копий. Далее процесс повторяется циклически. Принципиальным отличием NASBA от ПЦР является то, что в каждом цикле определяемый участок увеличивается не в 2 раза, а в несколько сотен раз. Достоинством метода является возможность обходиться без дорогостоящего термоциклера. В тоже время процесс изотермической амплификации весьма сложен и требует скоординированной работы трех термолабильных ферментов.

В настоящее время разработаны подходы, которые объединяют принципы иммуноанализа и генодиагностики. К числу таких методов можно отнести иммуносорбентную ПЦР (IS-PCR), применение которой было использовано при диагностике PVY на ротовом аппарате насекомых-переносчиков [209]. Диагностическая система ОТ-ПЦР-МГА-ИФА, объединила способы молекулярной гибридизации, амплификационного синтеза и иммуноанализа [210].

Таким образом, ПЦР используется для изучения разнообразия штаммов и популяционной структуры PVY в различных районах выращивания картофеля, но у нее есть свои ограничения. Основные недостатки заключаются в том, что современные методы ПЦР были разработаны на ограниченное количество изолятов PVY, требуют сложных смесей праймеров и подвержены ошибкам в интерпретации из-за разрешения размера полосы, в случае множественных инфекций, незарегистрированных событий рекомбинации и нуклеотидного полиморфизма, которые могут влиять на эффективность ПЦР. Полное секвенирование генома и филогенетические исследования – рекомендуемые методы для характеристики геномов PVY. Во многих странах при анализе семенного материала картофеля также используют ИФА, с 2012 года в Шотландии ОТ-ПЦР в реальном времени используется, по мере необходимости, для тестирования клубней семенного картофеля на наличие вирусов, в то время как подтверждающее тестирование на вирусы, вызывающие симптомы заболевания при инспекции урожая, в основном оценивается с помощью ИФА. Во Франции ОТ-ПЦР в реальном времени используется как дополнительный метод к ИФА [211].

На основании проведенного анализа обзора литературы необходимо заключить, что сравнение биологической и молекулярной характеристик групп штаммов PVY говорит об изменчивости вируса и трудоемкости определения изолятов. Для описания новых изолятов PVY необходима биологическая оценка и секвенирование CP и/или всего генома чтобы получить фенотипические и генотипические данные. Это является необходимым условием для эффективного мониторинга и борьбы с вирусами и их болезнями, а также для поддержания производства продуктов питания во всем мире. В Республике Казахстан повсеместные обследования зараженности посадок

картофеля вирусами современными методами диагностики, а также с учетом штаммовой принадлежности, не проводились. В настоящее время известно достаточно много методов диагностики растений на вирусоносительство: визуальная диагностика, индикаторная диагностика, серологическая диагностика, ПЦР-диагностика. Однако, для высокочувствительной и серийной диагностики вирусных заболеваний картофеля, как в странах СНГ, так и за рубежом до сих пор остается широко востребованным метод иммуноферментного анализа, особенно «метод двойных антител» («сэндвич-вариант»). Создание в ходе селекционного процесса новых сортов, устойчивых к PVY, наряду с безвирусным семеноводством картофеля, является эффективным способом предотвращения поражения картофеля вирусными болезнями. Идентификация генотипов картофеля устойчивых к PVY и обнаружение доминантных аллелей генов в сортах картофеля обеспечит высокий уровень защиты растений от всех, известных в настоящее время, штаммов PVY. Таким образом, в соответствии с выводами, поставленные цели и задачи исследований требуют решения.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

В процессе исследований использовались следующие растительные материалы сортов и селекционных линий картофеля (*Solanum tuberosum*): Акжар, Алая заря, Адиль, Артем, Валерий, Вид-1, Вид-2, Дуняша, Костанайские новости, Курант-1, Мечта Красавина, Удовицкий, Ягодный-19, 15 с-ц 7П41 х Добро, 23 сеянец 1069 х Адретта, 53 с-ц 52-99, 62.211.108.5 Тамаша х Ягодный-19, 10.28 Лазарь х Алая заря – предоставлены ТОО «СХОС «Заречное». Аксор, Альянс, Жанайсан, Ильин, Карасайский, Мирас, Нэрли, Памяти Конаева, Тохтар, Тустеп, Улан, Шаггалалы, 2-94-06, 1-9802, 12-07-03, 4-08-02, 27-10-03, 9-07-12, 32-07-01, 15-08-03 – предоставлены ТОО «КазНИИПО».

В процессе исследований использовались следующие материалы:

- 1) очищенный препарат Y-вируса картофеля PVY^{Ch};
- 2) тест-растения *Nicotiana tabacum* сорт Samsun, *Nicotiana glauca* сорт Гавана;
- 3) искусственная питательная среда Мурасиге и Скуга;
- 4) коммерческие наборы ИФА и ПЦР.

Для выполнения исследований использовали лабораторных животных: кроликов и мышей, а также следующее оборудование: термостаты (ОАО «Казахский завод медицинской аппаратуры»), сушильный шкаф («Snol»), центрифуги низкоскоростные (Ependorf, BECKMAN) Model J2-21 Centrifuge, центрифуга настольная (CM 50 Centrifuge), ультрацентрифуга с Basket-ротатором SW-28, комплект оборудования для колоночной хроматографии, весы аналитические, низкотемпературный холодильник, холодильники бытовые 4°C (Indesit, Бирюса), магнитная мешалка, стерилизатор паровой (ВК-35), термостат «НЕМЕН» POL-ЕКО (с автоматическим температурным и световым режимом), ИФА-лаборатория (спектрофотометр Stat Fax 4200, автоматическое промывочное устройство Stat Fax 2600, термошейкер Stat Fax 2200), ПЦР-лаборатория (ПЦР-бокс, амплификатор, BIO-RAD T-100, прибор для электрофореза BIO-RAD), автоматический секвенатор DNA analyzer 3730x1, твердотельный термостат (Thermo Block TDB-120, Латвия), ламинар-бокс Lamsystems БАВ п01 «Ламинар С»-1,2, (231.120), фитотрон и теплица ДУМ-2.

Место проведения исследований. Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии растений кафедры «Защита и карантин растений», научно-исследовательской платформе сельскохозяйственной биотехнологии (НИПСБ) НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», лаборатории прикладной генетики РГП «Национальный центр биотехнологии МОН РК», отделе биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ «ВНИИКХ им. А.Г. Лорха», а также в лаборатории селекции картофеля Татарского НИИ сельского хозяйства ФИЦ КазНЦ РАН, Россия.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Отбор проб для тестирования на зараженность вирусами

Для тестирования на вирусоносительство брали молодые физиологически развитые листья со среднего яруса растения. Пробы упаковывали в пакеты из бумаги, слабо впитывающей влагу. На пакете и в прилагаемом бланке указывалась информация об образце (сорт, симптомы поражения, дата сбора и др.) [4, с. 165]. Отбор клубневых проб производился в количестве 30 шт. каждого исследуемого сорта с дальнейшим нарушением периода покоя с помощью стимулирующего раствора, включающего гибберелловую кислоту и тиомочевину для последующего тестирования ростков [5, с. 62].

2.2.2 ПЦР-анализ

Выделение РНК у образцов, зараженных PVY проводили с использованием наборов «Рибо-сорб» (Интерлабсервис, Россия) и «Проба НК» (Агродиагностика, Россия), кДНК получали с использованием комплекта реагентов на матрице РНК «РЕВЕРТА-L» и «Агродиагностика». Реакционная смесь для ПЦР амплификации фрагментов PVY вируса включала в себя: праймеры (PVY-срF-8560 GAGCYTTCACTGAAAGATG, PVY-срR-9360 GGTGGTGTGCCTCTCTGT, PVY-срF-9120 AGAAGCGTATATAGAAATGCG, PVY-срR-9500 AGATAGATCCAGACATAGTCACTG, PVY-срR-9160 GCAGATTTTCGAAУ TAAACCATA праймеры были подобраны на основе базы NCBI) по 15 пмоль каждого, 10 м MTris-HCl (рН 8,8 при 25°C), 50 мМ KCl, 0,08% Nonidet P-40, 3 мМ MgCl₂, дНТФ в концентрации 200 нМ каждого, 1,5 единицы Taq ДНК полимеразы (Fermentas). Программа ПЦР амплификации: длительная денатурация 95°C-5 минут; 40 циклов 95°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 90 сек. Электрофорез проводили при длине волны 150 нм, силе тока 80 мА и напряжении 220 Вт [212, 213].

Для идентификации вирусов, штаммовой принадлежности PVY по M.Chikh-Ali [204, р. 91; 214-217] (таблицы 1, 2, 3), определении генотипа картофеля применяли метод классического ПЦР по стандартной методике [213, с. 43]. Для проведения анализа на содержание возбудителей вирусов картофеля использовали комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР амплификации кДНК фитопатогенных вирусов (формат «Форез») производства «Агродиагностика» согласно прилагаемой инструкции. Идентификацию штаммовой принадлежности Y-вируса картофеля проводили в лаборатории прикладной генетики РГП «Национальный центр биотехнологии МОН РК» с применением праймеров, заказанных в компании Lumiprobe (Москва), подобранных на основе обзора литературных источников [204, р. 92; 214, р. 937; 215, р. 864; 216, р. 271; 217, р. 179].

Таблица 1 – Температурно-временной режим амплификации по M.Chikh-Ali

Температура	Время	Количество циклов
1	2	3
94°C	4 мин	1
94 °C 64°C 72°C	30 сек 30 сек 90 сек	10
94 °C 62°C 72°C	30 сек 30 сек 90 сек	10
94 °C 60°C 72°C	30 сек 30 сек 90 сек	10
72°C	5 мин	1

Таблица 2 – Праймеры используемые для детекции штаммов Y-вируса картофеля

Название праймера (локализация гена)	Последовательность, 5' – 3'
S5585m	GGATCTCAAGTTGAAGGGGAC
A6032m	CTTGCGGACATCACTAAAGCG
n2258	GTCGATCACGAAACGCAGACAT
n2650c-a	TGATCCACAACCTTCACCGCTAACT
n5707	GTGTCTCACCAGGGCAAGAAC
o6266c-a	CTCCTGTGCTGGTATGTCCT
o2439c-a	CCCAAGTTCAGGGCATGCAT
n156	GGGCAAACCTCTCGTAAATTGCAG
o514	GATCCTCCATCAAAGTCTGAGC
n787	GTCCACTCTCTTTCGTAAACCTC
n2258	GTCGATCACGAAACGCAGACAT
o2172	CAACTATGATGGATTTGGCGACC
n2650c	TGATCCACAACCTTCACCGCTAACT
o2700	CGTAGGGCTAAAGCTGATAGTAG
o6400	GTAACCTCCTAAACAAATGGTGGTTTCG
n7577	ACTGCTGCACCTTTAGATACTCTA
Y03-8648	CTTTTCCTTTGTTTCGGGTTTGAC
SeroN	GTTTCTCCTATGTCGTATGCAAGTT

При постановке ОТ-ПЦР исследовали образцы одинаковой массы и объема. В случае коммерческих препаратов использовали разведение в концентрации – 1 мкг/мл.

Таблица 3 – Интерпретация результатов ПЦР

Амплификационные рамки	Фрагменты, п.н.	Детектируемый штамм
n2258 + o2439c	181	NTN N-Wi
o2172 + o2439c	267	O
n2258 + n2650c	398	N NTN
n5707 + A6032m	328	N
S5585m + A6032m	452	N NTN
S5585m + o6266c	689	ON-Wi
n156 + n787	633	N, NTN(A), N:O, E, NE-11
n156 + o514	278	SYR-III, 261-4
n2258 + n2650c	398	N
n2258 + o2700	441	NTN(A), NTN(B), N-Wi, N:O, E, 261-4
o2172 + o2700	532	O
S5585m + o6400	853	O, N-Wi, N:O, 261-4
n7577 + YO3-8648	1,076	SYR-I, SYR-II, SYR-III
n7577 + seroN	1,307	N, NTN(A), NTN(B), NA-N

Секвенирование изолятов PVY проводили на автоматическом секвенаторе DNA analyzer 3730xl с использованием комплекта реагентов BigDye 3.1 согласно инструкции производителя (Applied Biosystems, США). Для анализа нуклеотидных последовательностей применялись программы MEGA 5.1, BioEdit, BLASTn и SeqMan.

Выделение ДНК проводили с использованием наборов «ДНК-сорб-С» (Интерлабсервис, Россия). Обнаружение молекулярных маркеров доминантных аллелей генов устойчивости картофеля к PVY: RYSC3 (ген *Ry-and*), GP122-406 (ген *Ry-fsto*), YES3-3A (ген *Ry-sto*), STM003 (ген *Ry-sto*), Ry186 (ген *Ry-chc*), PVY38-530 (ген *Ry-chc*) и S1d11 (ген *Ny-I*) осуществляли также с помощью ПЦР. В качестве позитивных контролей использовали сорта картофеля Бобр и Sante, обладающие экстремальными генами устойчивости к PVY. Перечень праймеров, температурные режимы проведения ПЦР, применение реакции рестрикции для маркера GP122-406 и условия детектирования соответствовали методикам, приведенным в работах [57, p. 268; 150, p. 127; 154, p. 161; 158, p. 193; 218, 219].

2.2.3 Метод иммуноферментного анализа

Ячейки 96-луночного полистирольного планшета сенсibilizировали рабочим раствором антител в разведении 1:500 и объеме 0,1 мл и инкубировали в термостате при 37°C в течение 2-х часов. Для удаления неспецифически связавшихся антител планшет отмывали 3 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и 1 раз фосфатно-солевым буфером с твином (ФСБ-ТВ). Далее в лунки плат вносили сок тестируемых растений в количестве 0,1 мл и инкубировали в холодильнике при +4°C в течение ночи (14-15 часов). После инкубирования вируссодержащего материала планшет отмывали вышеописанным способом

для удаления не связавшегося антигена. Затем в лунки планшета вносили специфический конъюгат в разведении 1:500 в объеме 0,1 мл и инкубировали в термостате при 37°C в течение 1 часа. Повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанных продуктов реакции и вносили в лунки по 0,1 мл раствора субстратной смеси (0,05 М цитратно-фосфатный буфер pH-5,0, ортофенилдиамин (ОФД) 0,4 мг/мл, 0,01 М H₂O₂) и инкубировали планшет 10-15 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшета раствора 3 М серной кислоты в объеме 0,05 мл. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (Stat Fax 4200, США) при длине волны 492 нм против 630 нм. При проведении данного варианта ИФА применялись диагностические наборы ИФА для определения вирусов картофеля производства ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха [173, с. 5].

Проверка моноинфицированных клонов, а также идентификация изолятов на штаммовую принадлежность Y-вируса картофеля проводилась методом TAS-ELISA с использованием моноклональных антител коммерческими иммуноферментными наборами «Agdia» и «Neogen» (США согласно прилагаемой инструкции. В сенсibilизированные антителами к PVY - N ячейки 96-луночного полистирольного планшета вносили сок тестируемых растений в количестве 0,1 мл и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. После инкубирования вирусосодержащего материала (сок тестируемых растений) планшет отмывали 7 раз ФСБ-ТВ для удаления не связавшегося антигена. Затем в лунки планшета вносили специфический конъюгат в разведении 100 мкл/10 мл буферного раствора (ЕСМ-buffer) в объеме 0,1 мл и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. Повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанных продуктов реакции. Субстрат (pNPP, 1 мг/мл) вносили в объеме 100 мкл и инкубировали 60 минут при комнатной температуре. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра Stat Fax 4200, США при длине волны 405 нм против 630 нм.

2.2.4 Индикаторная диагностика штаммовой принадлежности PVY, накопление вируса в тест-растениях

Для искусственного заражения растений картофеля сортов Desiree, King Edward, Maris Bard, *N. tabacum* сорта Samsun NN, *N. alata* сорта Гавана инфекционным соком растений, пораженных различными штаммами PVY готовили инокулюм разведением в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,2). Листья растения, предназначенного для инокуляции, в соответствии со стандартной методикой [174, с. 19], слегка припудривали порошком карборунда, втирая инокулюм, после листья промывали водой из пульверизатора. Инокулированное растение затеняли на сутки и, далее, содержали на рассеянном свете. На 7-ой день после инокуляции проводили визуальную оценку развития симптомов вирусного заболевания. Для изучения динамики накопления вируса в тканях тест-растений проводили тестирование в ИФА. Всего заражалось по 30 растений каждого вида.

2.2.5 Размножение растительного материала

Перевод растений, инфицированных штаммами PVY, *in vitro* проводили в соответствии со стандартной методикой [220]. Растительный материал промывали дистиллированной водой и дезинфицировали в асептических условиях в ламинар-боксе вблизи горящего огня, используя стерильные инструменты. Последовательно инкубировали растительный материал, в предварительно приготовленные стерилизующие растворы, в 20% эталоне (1 мин), 5% - растворе хлорной извести (15 мин) и 5% - растворе хлорамина (20 мин). Материал затем пятикратно отмывали стерильной водой и помещали на питательную среду [221]. Работы с культурой изолированных органов и тканей растений проводились с использованием искусственной питательной среды на минеральной основе по Мурасиге и Скугу [222] в соответствии со стандартной методикой [220, с. 19]. Пробирочные растения культивировали при 3-4 тыс. люкс, при 20-23°C, относительной влажности воздуха – 70-80% и 16-часовом фотопериоде. Для получения инфекционного сока при инокуляции тест-растений применяли листья пробирочных растений, полученных из моноинфицированных клубней картофеля. С этой целью этого у клубней картофеля нарушали состояние покоя для получения ростков [5, с. 60].

Тест-растения выращивали из семян при температуре 24-25°C на коммерческом универсальном торфогрунте «Терра Вита», состав NPK: N 150 мг/л, P 270 мг/л, K 300 мг/л, pH 5,8-7,0. Выращивание растений картофеля в регулируемых климатических условиях осуществляли в фитотроне (температура 20-25°C, продолжительность освещения 16 ч, интенсивность освещения 5000-7000 люкс, влажность 60-70%, почва чернозем комковато-зернистого состава). Для изучения высаживали по 4 растения каждого образца в сосуда объемом 50 дм³. Для выращивания безвирусного картофеля в условиях защищенного грунта использовалась поликарбонатная теплица «ДУМ-2» площадью 18 м² с капельным орошением, установленной на территории АО «КАТУ им. С. Сейфуллина».

2.2.6 Иммунизация лабораторных животных, очистка поликлональных антител и получение конъюгатов

Для получения поликлональных антител, специфических к PVY иммунизацию кроликов проводили по двум схемам: а) 0-е сутки – подкожно 50 мкг вируса с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) в 5-6 точек вдоль позвоночника; 21-е сутки – подкожно 50 мкг вируса с ПАФ в 5-6 точек вдоль позвоночника; 35-е сутки – подкожно 1 мл 50 мкг вируса с ПАФ в 5-6 точек вдоль позвоночника. На 7-12-е сутки после последней инъекции – отбор крови; б) 0-е, 7-е, 21-е, 42-е сутки – подкожно (50 мкг вируса с ПАФ в 5-6 точек вдоль позвоночника. На 7-12 сутки после последней инъекции – отбор крови [223].

Для более широкого изучения иммуногенных свойств препарата PVY^{Ch} иммунизировали лабораторных белых мышей по следующим схемам: в) короткая схема иммунизации: 0-е сутки – 5 мкг вируса с полным адьювантом Фрейнда в объеме 100 мкл; 7-е сутки – 5 мкг вируса с неполным адьювантом

Фрейнда (НАФ), 100 мкл; 11-е сутки – 5 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; 12-е сутки – 5 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; 13-е сутки – 5 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; г) длительная схема иммунизации: 0-е сутки – 5 мкг вируса с полным адьювантом Фрейнда в объеме 100 мкл; 14-е сутки – 5 мкг вируса с неполным адьювантом Фрейнда, 100 мкл; 28-е сутки – 5 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; 42-е сутки – 5 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; д) длительная схема иммунизации: 0-е сутки – 10 мкг вируса с ПАФ, 100 мкл; 7-е сутки – 10 мкг вируса с НАФ, 100 мкл; 14-е сутки – 10 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; 21-е сутки – 10 мкг вируса с 0,1 М фосфатным буфером, 100 мкл; 25-е сутки – бустерная инъекция 5 мкг вируса в объеме 50 мкл [223, с. 91].

Нативные антисыворотки, полученные иммунизацией кроликов очищенными препаратом PVY^{Ch} разводили в 3 раза фосфатно-солевым буфером pH 7,2 (PBS) и наносили на активированную и уравновешенную этим буфером колонку, заполненную белок G-сефарозой в соотношении 5 мл сорбента на 10 мл нативной сыворотки и элюировали несорбированные белки PBS до получения значения A_{280} меньше 0,05. Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером pH 2,5, доводили до нейтральных значений с помощью 0,3 М трис-HCl буфера pH 9,0, осаждали добавлением равного объема насыщенного раствора сульфата аммония и осаждали антитела центрифугированием 15 минут при 10000 об/мин. Определяли содержание белка спектрофотометрически по поглощению при 280 нм и чистоту глобулиновой фракции по соотношению A_{280}/A_{252} . Далее часть иммуноглобулинов, используемых как покровные антитела, консервировали в 50% глицерине и хранили при -18°C , а другую часть конъюгировали с высокоочищенной пероксидазой хрена методом периодатного окисления [224]. Метод предложен японским исследователем Накане (1980). Суть метода состоит в модификации пероксидазы хрена с образованием активных альдегидных групп, которые затем реагируют с аминок группами антител с образованием основания Шиффа. Для стабилизации основания Шиффа конъюгат обрабатывают боргидридом натрия [225].

Изучение оптимального (рабочего) разведения полученных конъюгатов и антител. Специфические части использовались в трех вариантах, названных нами тест-система-1, тест система-2 и тест-система-3, для которых использовались разные разведения конъюгатов и антител к полученному вирусному препарату. В тест-системе-1 использовались высокосорбционные планшеты фирмы Microlon HB (Greiner, Германия). В тест-системе-2 использовались среднесорбционные планшеты (Медполимер, Россия). В тест-системе-3 использовались среднесорбционные планшеты итальянского производства («ALTO»).

2.2.7 Определение точки термической инактивации, периода сохранения инфекционности и предельного разведения сока

Определение ТТИ, ПРС и ПСИ проводили по стандартным методам [226, 227]. Для определения ТТИ исходные растворы вируса (экстракт листьев, разбавленный в отношении 1:5 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,6) наливали по 1 мл в пробирки Эппендорфа и помещали на 10 минут в твердотельный термостат, отрегулированный на определенную температуру. Диапазон прогрева составлял 52-67°C. Термически обработанным соком инокулировали соответствующие растения-индикаторы.

ПСИ определяли путем инкубации инфекционного сока в закрытых пробирках Эппендорфа при комнатной температуре (20-23°C) с последующим исследованием инфекционности образца, периодической инокуляцией тест-растений через различные интервалы времени. ПРС определяли титрованием инфекционного сока в пределах 10^{-1} - 10^{-6} . При изучении физических свойств вирусов в качестве индикатора использовали растения *N. tabacum* сорта Samsun [228, 229]. Выращивание растений картофеля в регулируемых климатических условиях осуществляли в фитотроне (температура 20-25°C, продолжительность освещения 16 ч, интенсивность освещения 5000-7000 люкс, влажность 60-70%, почва чернозем комковато-зернистого состава).

2.2.8 Определение вирусостойчивости сортов картофеля методом механической инокуляции

Согласно литературным источникам, для выделения форм, устойчивых к PVY, применяют инокуляцию наиболее вирулентным и вредоносным некротическим штаммом, так как устойчивость к этому штамму, как правило, сочетается с устойчивостью к штаммам обычной группы вируса [121, с. 653; 230]. Для искусственного заражения растений картофеля использовались очищенные вирусные препараты и коллекция местных изолятов PVY, а также растения картофеля сорта Невский, моноинфицированных изолятами Kzn20-11 и Kzn30-11, ранее охарактеризованных по биологическим и молекулярно-генетическим свойствам, как штаммы PVY-NTN(A) и PVY-NTN(B), соответственно [231]. Инокулом готовили с помощью разведения в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2). Инфицирование исследуемых образцов картофеля проводили на стадии 4-6 настоящих листьев. Оценку результатов проводили: а) путем визуального наблюдения развивающихся патологических симптомов на инокулированных растениях картофеля по истечению 40 суток после инфицирования; б) с помощью лабораторно-диагностического выявления PVY методом иммуноферментного анализа (ИФА) в листовых пробах, отобранных через 30 суток после PVY-инфицирования.

Статистическая характеристика выборок при изучении качественных признаков проводилась по Б.А. Доспехову [232] и А.В. Иванникову, В.П. Томилову [233]. Для всех данных принят уровень значимости 1% ($P_{0,01}$). Для статистической обработки применялись компьютерные программы «SNEDECOR», «Microsoft Excell 2010».

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Скрининг вирусных заболеваний в картофелеводческих посадках Республики Казахстан и поиск естественно инфицированных PVY клонов картофеля

На первом этапе проводимых исследований ставилась задача поиска местных изолятов PVY для последующего изучения его штаммового состава. В этой связи было проведено обследование посадок картофеля в различных регионах страны на наличие вирусных заболеваний (PVX, PVY, PVS, PVM, PVA, PLRV). Параллельно проводился отбор моноинфицированных клонов картофеля для создания отечественной иммуноферментной тест-системы для выявления PVY.

В результате тестирования 70 сортов и гибридов картофеля методом ИФА была дана оценка распространенности основных вирусов картофеля во различных регионах страны (Приложение В), (рисунок 1). При скрининге использовалась вторая репродукция семенного картофеля.

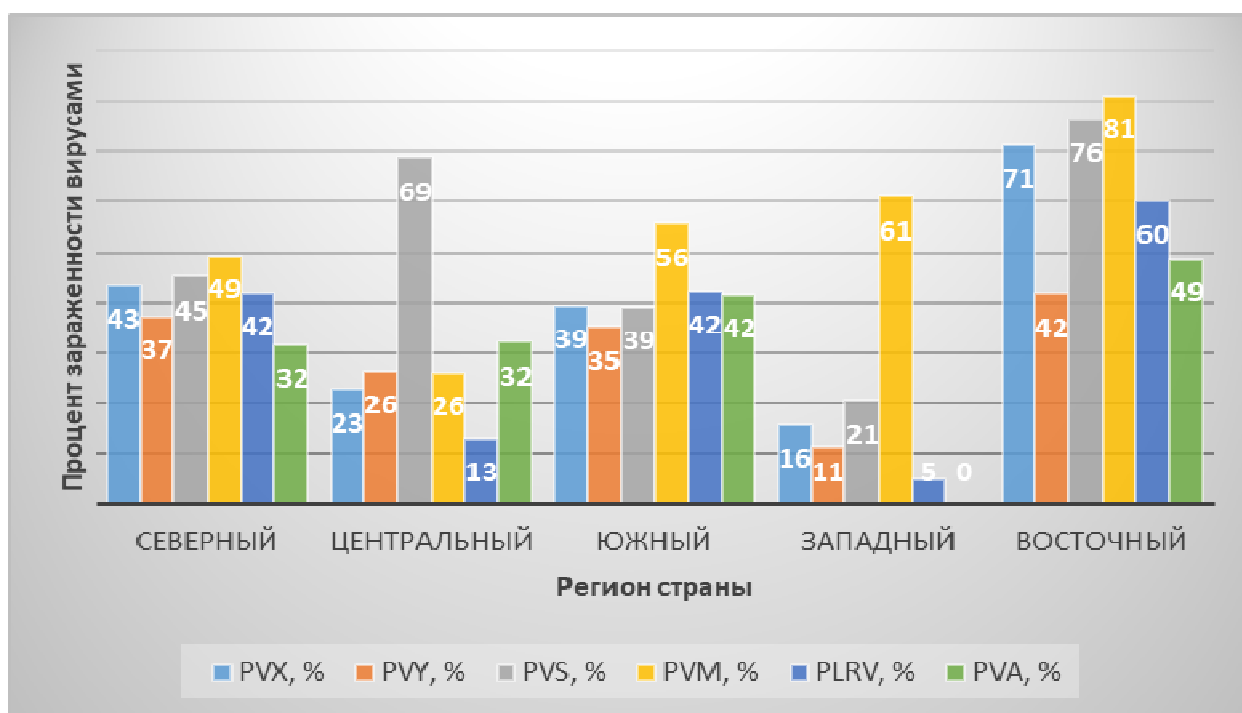


Рисунок 1 – Распространенность основных вирусов картофеля в картофелеводческих посадках Республики Казахстан по результатам ИФА

Согласно сводным данным представленным на рисунке 1, в Северном регионе Казахстана наблюдалось довольно равномерное распространение всех анализируемых вирусов, с небольшим преобладанием PVS и PVM. В Центральном регионе республики картофелеводческие посадки на 69% были заражены PVS, остальные изучаемые вирусы находились на одном уровне распространения ($\geq 30\%$). В Южном регионе страны распространение вирусов составляло около 40%, однако наибольшая доля была обнаружена у PVM –

56%. В Западном регионе установлено самое минимальное распространение вирусных болезней по стране, в основном анализируемые пробы поражены PVM. В Восточном регионе, в сравнении с остальными, по республике, наблюдалось максимальное заражение виروزами: пробы растений картофеля содержали от 42% PVY до 81% PVM [234, 235].

Данные результаты о тенденции распространения группы *Carlavirus* (PVS и PVM) на территории Казахстана [234, с. 16; 235, с. 25; 236] подтверждаются сравнительно недавними результатами других исследователей [237, 238].

Полученные данные также подтверждают известный факт увеличения распространения вирусов к югу и юго-востоку страны [239-241].

Анализируя степень распространенности PVY, следует отметить, что вирус присутствовал во всех зонах возделывания культуры картофеля. Данные рисунка 1 свидетельствуют о том, что максимальное распространение PVY выявлено в посадках картофеля Восточного Казахстана (42%), наименьшая пораженность – в Западном Казахстане (11%). Таким образом, распространение PVY также увеличивалось к южным и юго-восточным районам возделывания культуры, т.е. от климатических зон с прохладным климатом и достаточным увлажнением к зонам с высокими летними температурами и недостаточного или нерегулярного выпадения осадков [239, с.; 240, с. 254; 241, с. 522].

На основе проведенного скрининга из естественно зараженных посадок картофеля были отобраны клубни потенциально моноинфицированных клонов картофеля. Чистота отобранных клонов картофеля проверялась методом ОТ-ПЦР-анализа. Все результаты ОТ-ПЦР в сравнении с данными ИФА приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты ОТ-ПЦР-анализа отобранных образцов картофеля

Исследуемые сортообразцы	Результат ИФА	Результат ОТ-ПЦР						Отобрано	
		PVS	PV M	PV X	PV Y	PV A	PLR V	для иноку ляции	для штаммовой идентифи кации
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Северный Казахстан									
Artemis №15	PVY	+	+	–	+	–	–	-	+
Artemis №91	PVY	–	+	+	–	–	–	-	–
Artemis №79	PVY	–	–	–	+	–	–	+	+
Artemis №2	PVY	+	+	–	+	–	–	-	+
Cherie №10	PVY	–	–	–	+	–	–	+	+
PC	-	+	+	+	+	+	+	-	–
NC	-	–	–	–	–	–	–	-	–
Центральный Казахстан									
Artemis №89	PVY	+	+	–	–	–	–	-	–
Artemis №60	PVY	+	+	–	–	–	–	-	–

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PC	-	+	+	+	+	+	+	-	-
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Южный Казахстан									
Aladin №1	PVY	-	-	-	+	-	-	+	+
Aladin №2	PVY	-	-	-	+	-	-	+	+
Aladin №6	PVX	-	-	-	+	-	-	+	+
Агротип №29	PVA	-	+	-	+	-	-	-	+
Агротип №30	PVA	-	-	-	+	-	-	+	+
PC	-	+	+	+	+	+	+	-	-
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Западный Казахстан									
Gala №46	PVY	-	+	-	+	-	-	-	+
Gala №86	PVY	-	+	-	+	-	-	-	+
Gala №92	PVY	-	+	+	+	-	-	-	+
PC	-	+	+	+	+	+	+	-	-
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Примечания:									
1. «+» – положительный результат.									
2. «-» – отрицательный результат									

Согласно данным таблицы 4, установлено, что в большинстве анализируемых образцах обнаружена скрытая смешанная вирусная инфекция, лишь в пробах Artemis №79, Cherie №10, Aladin №1, №2, №6 и Агротип №30 была обнаружена моноинфекция PVY. Данные клоны были отобраны для инокуляции растений-накопителей с целью разработки отечественной диагностической тест-системы ИФА.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что метод ИФА имеет недостатки в точности результатов: из-за перекрестных реакций возможны ложно-положительные и ложно-отрицательные результаты, чувствительность метода позволяет обнаружить в образце белковую оболочку вируса в концентрации 10 нг/мл [242] по сравнению методом ПЦР-анализа, обладающего способностью определить наличие уже одной молекулы инфекционного агента в тысяче клеток [243, 244]. Кроме того, метод ОТ-ПЦР основан на подборе конкретных праймеров строго в соответствии с нуклеотидными последовательностями целевого генома вируса [237, р. 39]. Таким образом, результаты, полученные с помощью ПЦР анализа обладают большей диагностической ценностью в поиске моноинфицированных изолятов вирусов. Метод ИФА хорош в случае серийных полевых анализов большого количества проб для получения общей картины пораженности виروزами.

Таким образом, в результате скрининга установлено распространение основных вирусов картофеля по Казахстану. В результате проведенного поиска моноинфицированных изолятов PVY методом ПЦР-анализа были отобраны для

дальнейших исследований следующие клоны картофеля: Artemis №79, Cherie №10, Aladin №1, №2, №6 и Агротип №30.

3.2 Идентификация штаммовой принадлежности отечественных изолятов Y-вируса картофеля

С целью выделения распространенных на территории страны штаммов PVY, на следующем этапе исследований осуществлялась идентификация штаммовой принадлежности, естественно зараженных вирусом сортообразцов картофеля.

Для определения принадлежности к O- и N-серотипам PVY отечественные изоляты, отобранные из сортов картофеля, возделываемых в различных регионах Казахстана, были протестированы коммерческими ИФА-наборами Neogen на основе специфических моноклональных антител (таблица 5).

Таблица 5 – Результаты тестирования на определение серотипа PVY

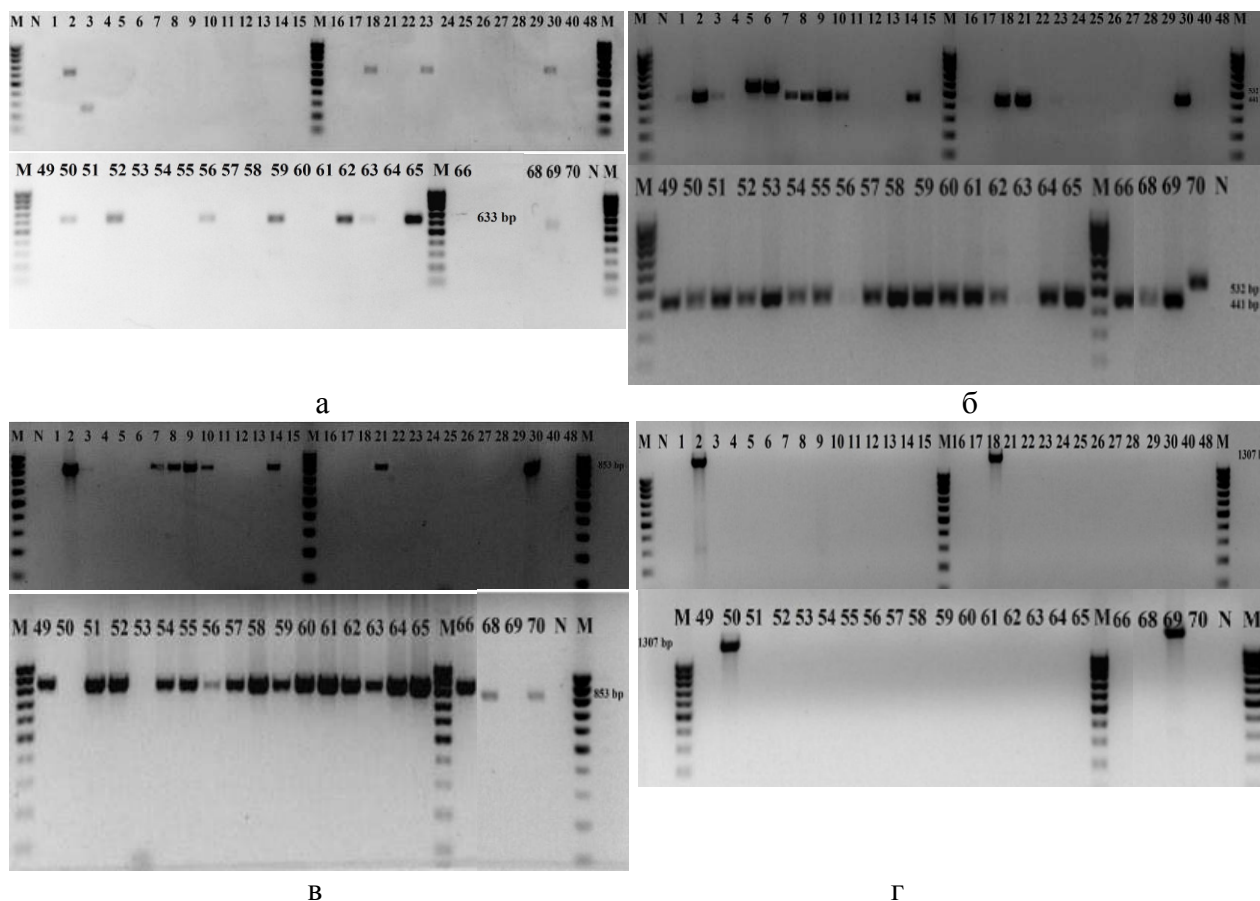
Область / страна, регион	Образец	Результат тестирования			
		ИФА-наборами			ОТ-ПЦР
		ВНИИКХ (X,Y,S,M,L,A)	Neogen PVY ^O	Neogen PVY ^N	
1	2	3	4	5	6
Акмолинская	Artemis №2	X,Y,S,M,L,A	+/-	+/-	+/-
	Artemis №79	Y	+	-	+
	Rodrigo	X,Y,S,L,A	+	-	+
	Sante №15	X,Y,S,M,L,A	+	-	-
	Cherie №10	Y	+	+	+
	Препарат PVY ^{Ch} , 1 мкг/мл	Y	+	+	+
Кызылординская	Aladin №1	Y	+	-	+
	Aladin №2	X, Y	+	-	+
Алматинская	Агротип №29	Y, M	+	-	+
	Агротип №30	Y	+	-	+
	Аксор №1	X,Y,S,M,L,A	+	-	-
	Аксор №99	X,Y,S,M,L,A	+	-	-
	Астана №128	X,Y,S,M,L,A	-	+	-
	Нэрли №17	Y,S, M, L	+	+	+
	Мирас №9	Y,S, M, L	+	+	-
Южно- Казахстанская	Красная заря	X,Y,S,M,L,A	+/-	+/-	-
	Aladin №6	Y	+	+	+
Восточно- Казахстанская	Аксор №2	Y,S, M, L	+	-	+
	Жанайсан №4	X,Y,S,L,A	+	+	-
	Мирас №4	X,Y,S,L,A	+	+	+
	Эдем №1	X,Y,S,L,A	+	+	-

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6
Костанайская	Мечта Красавина №18	Y,S,L,A	+	+/-	-
	Невский №29	X,Y,S,M,L,A	+	+	-
	Невский №30	X,Y,S,M,L,A	+	+/-	+
	Гибрид Коктем х Лина Костаная	X,Y,S,M,L,A	-	-	-
	Коктем х Лина Костаная	X,Y,S,M,L,A	-	-	-
Западно-Казахстанская	Gala №86	Y, M	+	-	+
	Gala №92	X,Y,M	-	+	+
	Никитка №73	Y	+	-	+
	Никитка №74	Y	+	-	+
	Никитка №75	Y	+	-	+
	Никитка №77	Y	+	-	+
	Никитка №78	Y	+	-	+
	Никитка №79	Y	+	-	+
	Никитка №80	Y	+	-	+
	Никитка №81	Y	+	-	+
	Никитка №82	Y	+	-	+
	Никитка №83	Y	+	-	+
	Никитка №85	Y	+	-	+
	Никитка №86	Y	+	-	+
	Никитка №87	Y	+	-	+
Никитка №88	Y	+	-	+	
Никитка №89	Y	+	-	+	
Никитка №90	Y	+	-	+	
РС	PVY ^{OZ}	Y	+	-	+
	PVY ^{NW1}	Y	+	-	+
	PVY ^{NTN HRI N}	Y	-	+	+

Согласно полученным данным, из 44 проверенных на штаммовую принадлежность методом ИФА сортообразцов картофеля в ОТ-ПЦР подтвердили наличие Y-вируса только 29 образцов, из них методом ИФА (Mab) выявлено 24 клон с O-серотипом, 1 клон – N-серотип, 4 – принадлежат к обоим серотипам. Таким образом, в исследуемых сортообразцах преобладает O-серотип PVY, при этом наблюдается относительно равномерное распределение в стране зараженных вирусом образцов по серологическим группам, за исключением Западного Казахстана [245].

На следующем этапе проводимых исследований данные образцы были проанализированы в мультиплексном ОТ-ПЦР со штаммо-специфическими праймерами (рисунок 2, таблица 6).



а – 1-ая рамка считывания (праймеры: n2258 + n2650c; n156 + o514; n156 + n787); б – 2-ая рамка считывания (праймеры: n2258 + o2700; o2172 + o2700); в – 3-ая рамка считывания (праймеры: S5585m + o6400); г – 4-ая рамка считывания (праймеры: n7577 + YO3-8648; n7577 + seroN); М - молекулярный маркер 100 п.н. (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas); N – негативный контроль (NC)

Рисунок 2 – Электрофореграммы ПЦР-анализа исследуемых изолятов

Примечание – Названия исследуемых образцов приведены в таблицах 10-11

Таблица 6 – Результаты идентификации штаммовой принадлежности исследуемых изолятов PVY

Область	Образец	278 п.н.	398 п.н.	441 п.н.	532 п.н.	633 п.н.	853 п.н.	1076 п.н.	1307 п.н.	Штамм
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Акмолинская	Artemis №2	-	-	+	-	-	-	-	-	рекомбинант по RJ2
	Artemis №79	-	-	+	-	+	+	-	+	NTN(A)+N-Wi (A)
	Родриго	+	-	+	-	-	-	-	-	SYR-III
	Cherie №10	-	-	+	-	-	-	-	-	рекомбинант по RJ2
	Препарат PVY ^{Ch} (1 мкг/мл)	-	-	+	-	-	-	-	-	рекомбинант по RJ2

Продолжение таблицы 6

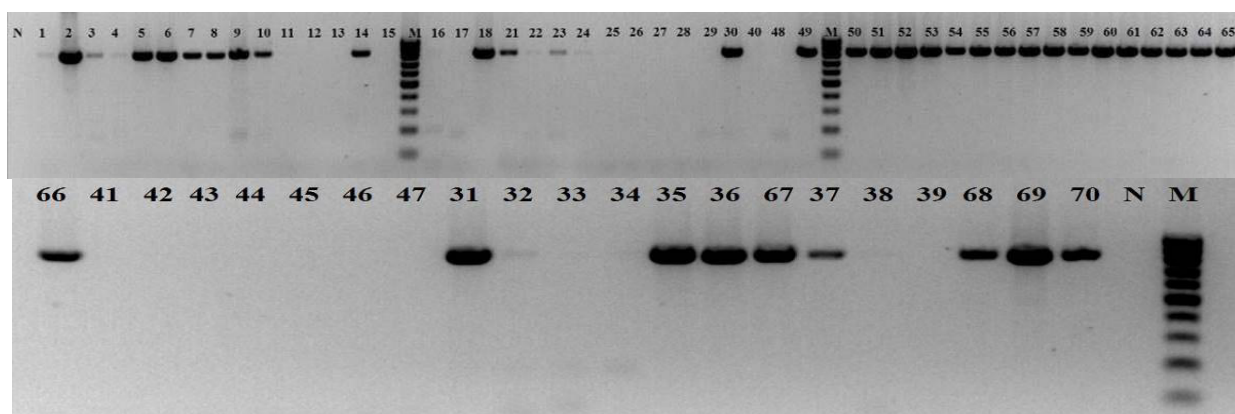
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Кызылординская	Aladin №1	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi (B)
	Aladin №2	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi (B)
Алматинская	Агротип №29	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi (B)
	Агротип №30	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi (B)
	Аксор №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Аксор №99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Астана №128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Нэрли №17	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi (B)
	Мирас №9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ЮКО	Красная заря	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Aladin №6	-	-	+	-	+	-	-	+	NTN (A)
ВКО	Аксор №2	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Жанайсан №4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Мирас №4	-	-	-	-	+	-	-	-	NE-11
	Эдем №1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Костанайская	Мечта Красавина №8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Невский №29	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Невский №30	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)
	Коктем х Лина Костаная	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Коктем х Лина Костаная	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Западно-Казахстанская	Gala №86	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Gala №92	-	-	+	-	+	-	-	-	NTN (A)
	Никитка №73	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №74	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)
	Никитка №75	-	-	+	-	-	-	-	-	рекомбинант по RJ2
	Никитка №77	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №78	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №79	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)
	Никитка №80	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №81	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №82	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Никитка №83	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №85	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №86	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)
	Никитка №87	-	-	-	-	-	+	-	-	рекомбинант
	Никитка №88	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	Никитка №89	-	-	+	-	+	+	-	-	N-Wi (A)
	Никитка №90	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
РС	PVY ^{NWi}	-	-	+	-	-	+	-	-	N-Wi(B)
	PVY ^{NTN HRI}	-	-	+	-	+	-	-	+	NTN (A)
	PVY ^{OZ}	-	-		+	-	+	-	-	O
Примечания:										
1. «+» – положительный результат.										
2. «-» – отрицательный результат										

Согласно полученным результатам установлено, что большинство образцов местных изолятов PVY были поражены штаммом N-Wi (22 из 31), 2 – NTN, 1 – NTN+N-Wi, 1 – SYR-III, 1 – NE-11 и 1 образец – O, 5 изолятов оказались рекомбинантами.

Далее все исследуемые образцы изолятов были секвенированы с целью определения генотипов и выявления новых рекомбинаций в вирусе с помощью подобранных праймеров на наиболее рекомбинируемые участки. Перед секвенированием образцов, полученные ПЦР-продукты прошли форез в 1,5% агарозном геле, результаты представлены на рисунке 3.



Праймеры: PVY-срF-8560, PVY-срR-9360; M - молекулярный маркер 100 п.н. (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas); N – негативный контроль (NC)

Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов исследуемых образцов, зараженных местными изолятами PVY

Примечание – Названия исследуемых образцов приведены в таблицах 10-11

В результате проведенных исследований получены ПЦР продукты с молекулярной массой около 800 пар нуклеотидов (п.н.). Таким образом, каждая полученная последовательность составляла не менее 800 п.н., что достаточно для достоверного определения субгруппы вируса и выявления возможных рекомбинаций.

В результате секвенирования изучаемых изолятов PVY были получены нуклеотидные последовательности фрагментов, локализованные в разных частях генома штамма вируса (Приложение Г). Анализ BLASTn образцов с N-Wi (А) выявил 99% идентичность с изолятом SYR-II (номер доступа GenBank AB461453.1). Анализ BLASTn образцов с N-Wi (В) показал 99% сходство последовательностей с SYR-Wi-11 (AB185832.1). Образцы с NTN выявили в BLASTn 99% идентичность с изолятом 11627-12 (KC634007.1).

Кроме того, согласно полученным результатам, особый интерес, вызвали изоляты, выявленные в Западном регионе Казахстана. Из 17 положительных образцов, 8 последовательностей изолятов картофеля сорта Никитка продемонстрировали в BLASTn 100% идентичность с изолятом IUNG-14 (PVY N:O, JF927762). Последовательности остальных семи изолятов сорта Никитка и одного сорта Gala №86 показали 99% сходства с последовательностью сирийского изолята SYR-Wi-11 (AB185832; PVY^{N-Wi}). Последовательность второго изолята сорта Gala №92 показала более 99% идентичности с IUNG-4 (JF927752; PVY^{NTNa}). Четыре изолята с разными штаммами были депонированы в GenBank с номерами доступа MK639789 - MK639792.

Таким образом, установлены три рекомбинантных штамма PVY (N:O, N-Wi и NTNa) в западном Казахстане. Известно, что рекомбинанты N:O и N-Wi относятся к серотипу O, а рекомбинант NTNa вызывает PTNRD у восприимчивых сортов картофеля [52, p. 571; 66, p. 138]. Рекомбинанты N: O, N-Wi и NTNa ранее были зарегистрированы в Северной Америке [246, 247] и Китае [248]. На настоящий момент, это первая совершенная идентификация рекомбинантов N:O, N-Wi и NTNa в сортах картофеля в Казахстане, данные результаты были опубликованы в журнале Plant Disease [249].

Для субгенотипирования было построено филогенетическое дерево на основании секвенированных нуклеотидных последовательностях 16 местных изолятов PVY и штаммов, депонированных NCBI (National Center for Biotechnology Information) рисунок 4.

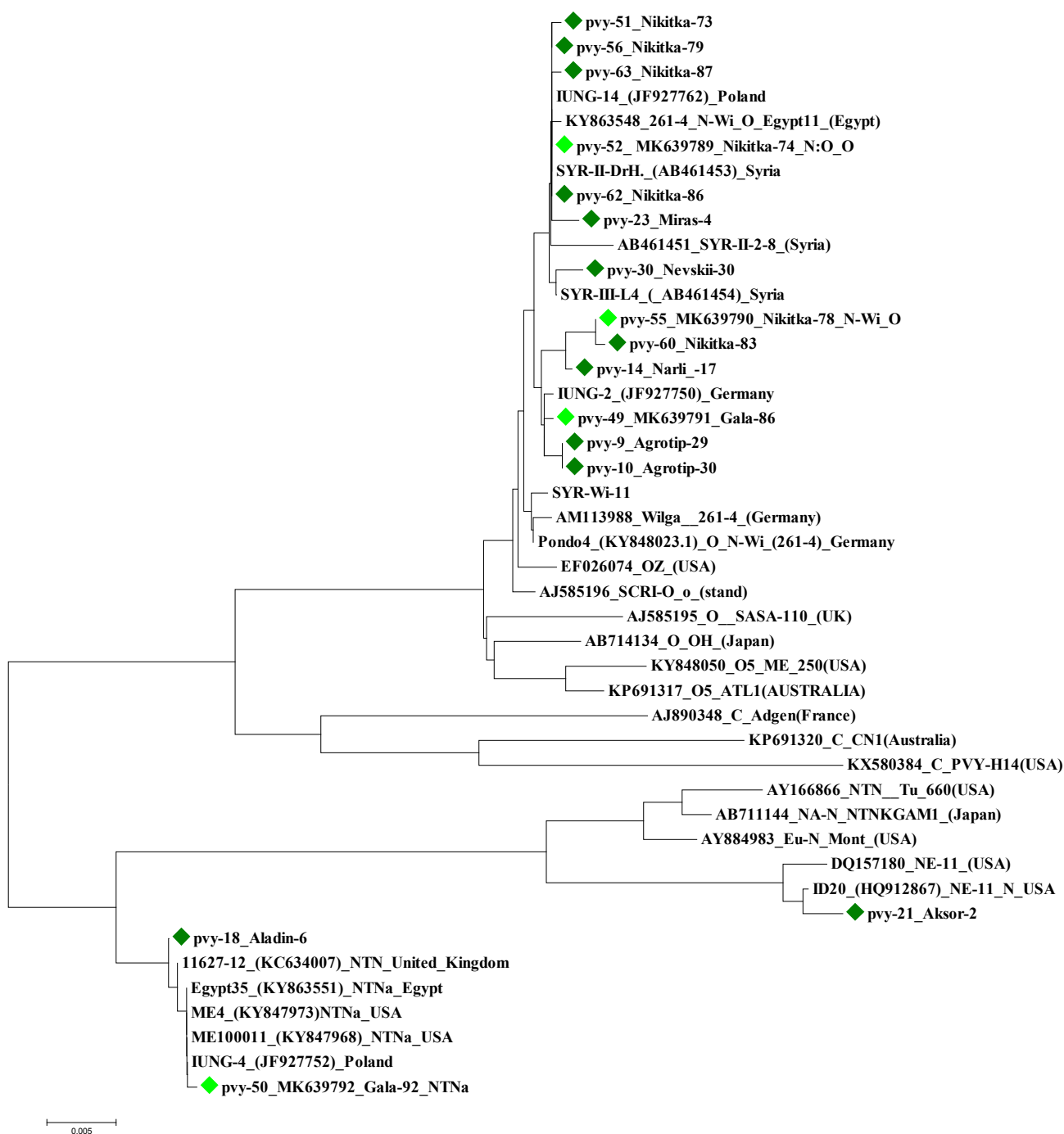


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево, построенное методом Neighbor-Joining Tree на основании данных секвенирования 16 изолятов, расчет эволюционных дистанций проведен по алгоритму Джукса-Кантора

В филогенетических конструкциях, согласно рисунку 4 исследуемые изоляты с N-Wi сгруппированы плотно в пределах SYR-II и SYR-Wi-11 PVY^{N Wi} штамм-группы, а изоляты с NTN оказались в одном кластере с 11627-12, Egypt35 (KY863551) и IUNG-4 (JF927752) NTN штамм-группы, образец №21 сгруппировался в один кластер с изолятом ID20 (HQ912867) штамм NE-11.

3.2.1 Изолят Cherie №10

Молекулярная форма образца Cherie №10 в настоящее время неизвестна, предполагается наличие точки рекомбинации между РЗ- и VPg- генами вируса. Принимая во внимание, что данный образец по серологическим свойствам относится к О-серогруппе, можно предполагать наличие точки рекомбинации VPg -и CP-генами. Нуклеотидная последовательность уникальная, близкие гомологи (97%) выявлены в Японии и США (OH(AB714134), ONGOB6 (AB711152), ME89-107(HQ912876) [58, p. 778; 92, p. 661; 250]. В дополнение к молекулярным исследованиям штаммовой идентификации изолята Cherie №10, провели его биологическое тестирование. Для инокуляции использовались индикаторные растения табака и картофеля: *N. tabacum* сорт Samsun NN, *S. tuberosum* сортов Desiree, King Edward, Maris Bard. Симптомы учитывали на 7-е и 14-е сутки после инокуляции (рисунок 5).



Рисунок 5 – Симптомы морщинистой мозаики на листьях *N. tabacum* Samsun на 14-е сутки после инокуляции изолятом Cherie №10

На всех инокулированных растений табака, по истечении 14 суток после инокуляции изолятом Cherie №10 появились мозаичность и морщинистость листьев [227, с. 41; 46, с. 162]. Сорто-дифференциаторы инокулировали Cherie №10 по 4 листа каждого. На 7-е сутки после инокуляции на листьях картофеля сорта Desiree проявлялись локальные некрозы и некротизация жилок. На листьях сортов King Edward и Maris Bard обнаружено посветление жилок, однако, у Maris Bard помимо посветления жилок наблюдалась некротизация (рисунок 6). В результате эксперимента отмечена системная некротизация листьев картофеля сорта Desiree, что подтверждает принадлежность исследуемого изолята к О-серогруппе PVY.



Рисунок 6 – Инфицирование сортов-дифференциаторов
изолятом Cherie №10 - изолированные листья

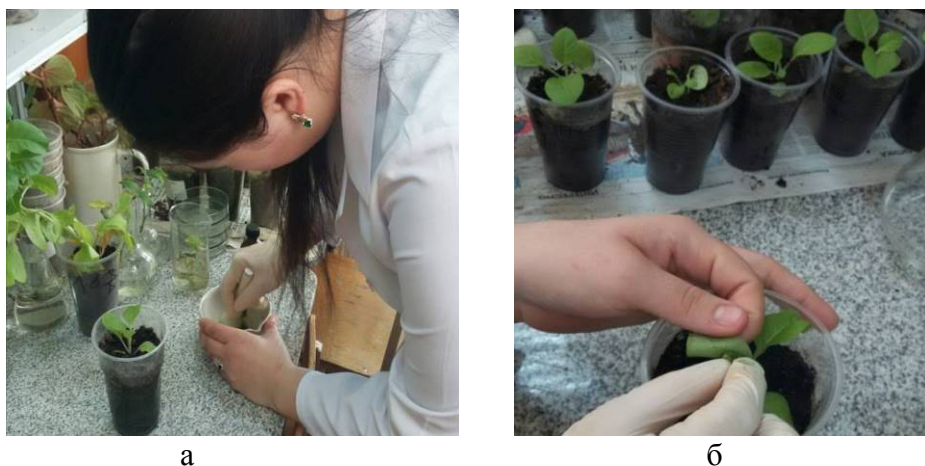
Таким образом, осуществлена идентификация штаммовой принадлежности исследуемых изолятов PVY, согласно результатам субгенотипирования штаммовый состав исследуемых изолятов представлен в основном, PVY^{N^{Wi}}, PVY^{NTN}, PVY^{NE-11} и PVY^O штамм-группами вируса.

3.3 Создание коллекции изолятов PVY и поддержание в культуре изолированных органов и тканей растений

Для создания отечественной диагностической тест-системы для выявления PVY, а также во избежание инактивации вируса и потери инфицированного растительного материала отобранные на первом этапе исследований моноинфицированные PVY сортообразцы Artemis №79 (Акмолинская область, Северный Казахстан), Aladin №1 (Кызылординская область, Южный Казахстан), Cherie №10 (Акмолинская область, Северный Казахстан), являющимися естественно зараженными вирусом клонами, были выбраны для накопления в тест-растениях и перевода *in vitro*.

В качестве накопителей Y-вируса картофеля, в особенности, при разработке иммунодиагностических тестов, сегодня широко используются растения *Nicotiana tabacum* сорта Samsun [174, с. 37; 224, с. 10; 227, с. 41]. Как известно, растения *Nicotiana tabacum* L. в ответ на заражение вирусом реагируют системно: на штаммы PVY^O и PVY^C – посветлением и окаймлением жилок неинокулированных и отрастающих листьев, а на PVY^N – некрозами основных жилок. Некротические поражения нередко захватывают и стебли зараженных растений. Системный тип реакции к изучаемому вирусу выявлен также и у других представителей рода *Nicotiana*: *N. glutinosa* L., *N. sylvestris* Speg., *N. debneyi* Domin., *N. clevelandii* L., *N. alata* L., *N. digluta* L., *N. megalosiphon* L., *N. acuminata* L [46, с. 162].

В наших исследованиях для накопления исследуемых изолятов УВК, применялись тест-растения *N. tabacum* сорта Samsun и *N. alata* сорта Гавана. На рисунке 7 представлен процесс инокуляции растений *N. tabacum* изучаемыми изолятами PVY в фазу трех-четырёх листьев, а также в фазу зрелой рассады.



а – приготовление инокулюма; б – втирание инокулюма в лист растения

Рисунок 7 – Инокуляция тест-растений *N. tabacum* сорта Samsun местными изолятами PVY в фазу 3-4-х листьев (а) и зрелой рассады (б)

Изучение динамики накопления различных штаммов PVY проводили на примере изолята Cherie №10 и PVY⁰ (контроль) на растениях *N. tabacum* в течение 10-45 суток (таблица 7).

Таблица 7 – Динамика накопления У-вируса картофеля в тест-растениях *Nicotiana tabacum* сорта Samsun

№ образца	Источник инфекции, штамм / изолят	Экстинция, о.е.														
		10-е сутки			15-е сутки			20-е сутки			30-е сутки			45-е сутки		
		X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2	Cherie №10	0,043	2,5	+/-	0,037	2,1	+/-	0,506	17,4	+	0,481	16,6	+	0,055	1,9	-
3	Cherie №10	0,897	52,7	+	0,029	1,7	-	0,424	14,6	+	0,245	8,5	+	0,694	23,9	+

Продолжение таблицы 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
9	Cherie №10	0,094	5,5	+	0,377	22,1	+	0,280	9,7	+	0,251	8,7	+	0,633	21,8	+
2	PVY ⁰	1,260	74,1	+	0,963	56,6	+	0,196	6,8	+	0,150	5,2	+	0,320	11,0	+
3	PVY ⁰	1,163	68,4	+	0,836	49,1	+	0,256	8,8	+	0,236	8,1	+	0,436	15,0	+
4	PVY ⁰	0,943	55,5	+	0,964	56,7	+	0,306	10,6	+	0,290	10,0	+	0,560	19,3	+
5	PVY ⁰	0,937	55,1	+	0,676	39,7	+	0,224	7,7	+	0,231	7,9	+	0,716	24,7	+
6	PVY ⁰	1,023	60,1	+	0,664	39,0	+	0,236	8,1	+	0,203	7,0	+	0,229	7,9	+
9	PVY ⁰	0,053	1,9	-	0,033	1,9	-	0,043	2,5	+/-	0,047	1,6	-	0,002	0,1	-
PC		1.239					0.563									
NC		0.017					0.029									

Согласно данным, приведенным в таблице 7, накопление изолята Cherie №10 в ювенильных растениях *N. tabacum* происходило нестабильно, максимум относительной концентрации вируса (экстинции) наблюдался преимущественно на 20-30-е сутки, что соответствует литературным данным [174, с. 22]. Однако, максимальное содержание российского изолята PVY⁰ отмечено на 10-е сутки, по данным Блоцкой Ж.В. инкубационный период штамма PVY⁰ в растении *N. tabacum* составляет 10-12 суток, во время которого происходит размножение и накопление вируса в клетках [227, с. 60].

В проводимом эксперименте при инфицировании растений табака изолятом Cherie №10 в фазе взрослой рассады наблюдалось 100% заражение, проявляемое в виде сильновыраженных симптомов морщинистой мозаики листьев, при заражении тест-растений PVY⁰ симптомы были менее выражены, но также наблюдалась характерная мозаика листовой пластинки [180, с. 40; 227, с. 61] (рисунок 8).



а



б

а – морщинистая мозаика; б – мозаика, деформация листьев растения

Рисунок 8 – Симптомы PVY изолятов Cherie №10 (а) и PVY⁰ (б), проявляемые на листьях *N. tabacum*

Изучение динамики накопления местных изолятов Y-вируса Aladin №1 и Artemis №79 проводили в растениях-накопителях *N. alata* (таблица 8).

Таблица 8 – Динамика накопления Y-вируса картофеля в тест-растениях *Nicotiana alata* сорта Гавана

№ образца	Источник инфекции, штамм / изолят	Экстинция, о.е.								
		10-е сутки			15-е сутки			20-е сутки		
		X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P	X Ao	Ao/Aк	P
1	Artemis №79	0,044	0,7	-	0,052	0,9	-	0,977	37,6	+
2	Artemis №79	0,029	0,5	-	0,309	5,1	+	0,032	1,2	-
3	Artemis №79	0,057	0,9	-	0,064	1,0	-	0,049	1,9	-
4	Artemis №79	0,187	3,1	+	0,124	2,0	-	0,777	29,9	+
1	Aladin №1	0,000	0,0	-	0,042	0,7	-	0,038	1,5	-
2	Aladin №1	0,000	0,0	-	0,052	0,9	-	0,106	4,1	+
3	Aladin №1	0,049	0,8	-	0,032	0,5	-	0,018	0,7	-
4	Aladin №1	0,012	0,2	-	0,033	0,5	-	0,017	0,7	-
PC		1,364						0,988		
NC		0,061						0,026		

Согласно, представленным в таблице 8, данным, максимум относительной концентрации изолята Artemis №79 в тест-растениях достигал на 20-е сутки, в соответствии с литературными данными [174, с. 22; 227, с. 61]. Заражение растений *Nicotiana alata* изолятом Aladin №1 не произошло. Получение отрицательных результатов по инокуляции тест-растений изолятом Aladin №1, возможно связано со слабой инфекционностью вирусного инокулюма [180, с. 62].

На следующем этапе наших исследований определялся рабочий титр PVY в инфекционном соке инокулированных тест-растений в сравнении с источником инокуляции в «сэндвич-варианте» ИФА (таблица 9).

Таблица 9 – Титры изолятов PVY в тест-растениях, «сэндвич-вариант» ИФА

Вид растения / изолят	Титр вируса в тест-растении															
	Без разведения	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384
<i>N. tabacum</i> Cherie №10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>N. tabacum</i> PVY ⁰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>N. alata</i> Artemis №79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. tuberosum</i> , Artemis №79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. tuberosum</i> , Aladin №1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Согласно данным таблицы 9, титр исследуемого изолята Cherie №10 в тест-растениях *N. tabacum* составлял 1:2048. Титр российского изолята PVY⁰ в данных тест-растениях (1:256) уступал в 8 раз титру Cherie №10. Наибольший титр вируса в инфекционном соке оказался у изолята Artemis №79 в тест-растении *N. alata*, в картофеле этот же изолят реагировал на один порядок меньше. Титр изолята Aladin №1 в растении картофеля составлял 1:16.

При изучении физических свойств изолятов PVY, таких как точка термической инактивации и предельное разведение сока: вирус инактивируется при 67°C у изолята Artemis №79, при 63°C – у изолята Cherie №10; изолят Artemis №79 являлся более патогенным изолятом в сравнении с Cherie №10, период сохранения инфекционности составил 10-11 суток и 7 суток, предельное разведение сока - 10⁻⁴ и 10⁻³ соответственно [227, с. 46; 251].

Таким образом, в изолированных условиях были инокулированы растения-накопители местными изолятами PVY, изучена динамика накопления

и титр изолятов вируса в инфекционном соке с целью дальнейшей разработки тест-системы ИФА для диагностики Y-вируса картофеля.

Известно, что технология *in vitro* позволяет получать экологически чистое сырье круглый год, увеличивать выход биологически активных веществ, вирусных препаратов и регулировать их накопление в культуре ткани [174, с. 37]. Кроме того, наличие коллекции местных изолятов вирусов картофеля, поддерживаемых в культуре изолированных органов и тканей растений, устраняет рутинную работу по инокуляции и накоплению вирусов картофеля, обеспечивает круглогодичный доступ к антигенам при создании диагностических тестов.

На следующем этапе наших исследований, проводился перевод изолятов в культуру изолированных органов и тканей растений. Важной задачей данного этапа исследования являлись качественный и количественный подбор антисептиков и оптимизация режимов стерилизации.

В проводимых исследованиях все моноинфицированные клоны картофеля (ростки клубней сортов: Artemis №79, Aladin №1) были переведены в культуру *in vitro* на безгормональную питательную среду Мурасиге-Скуга (рисунок 9).



Рисунок 9 – Перевод местных изолятов Y-вируса картофеля *in vitro*

На данном этапе исследований нами было изучено четыре способа стерилизации ростков клубней картофеля с применением водных растворов стерилизующих агентов с различными экспозициями растительного материала. Результаты стерилизации ростков клубней изучаемых сортов картофеля приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Подбор оптимальных способов стерилизации ростков клубней картофеля изолятов PVY

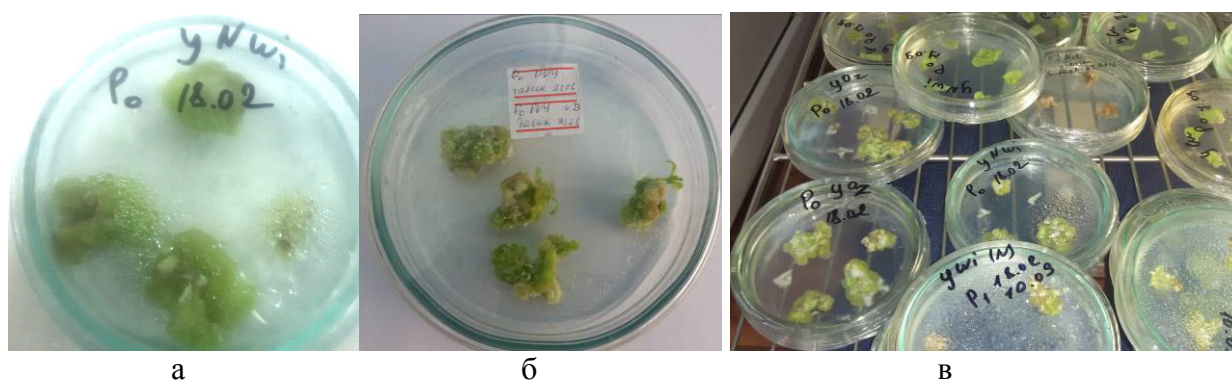
Способ стерилизации	Количество исходных ростков, шт.	Количество стерильных жизнеспособных ростков, шт.	Выход стерильных растений, %
Artemis №79			
1 мин - 20% этанол; 15 мин - 2% хлорная известь; 20 мин -5% гипохлорит Na	35	0	0
1 мин - 20% этанол; 15 мин -7% гипохлорит натрия с 0,025% мертиолятом Na	35	20	57
15 мин - 7% гипохлорит Na	35	25	71
10 мин - 1% сулема	35	0	0
НСР(1%)	-	-	2,72
m,%	-	-	1,93
Aladin №6			
1 мин - 20% этанол; 15 мин - 2% хлорная известь; 20 мин -5% гипохлорит Na	35	0	0
1 мин - 20% этанол; 15 мин -7% гипохлорит натрия с 0,025% мертиолятом Na	35	25	71
15 мин - 7% гипохлорит Na	35	15	43
10 мин - 1% сулема	35	0	0
НСР(1%)	-	-	2,60
m,%	-	-	2,35

Наиболее эффективным способом стерилизации ростков клубней картофеля сорта Aladin №1 оказался вариант, включающий 20% этанол в течение 1 мин, с последующей обработкой в комбинированном растворе 7% гипохлорита Na с мертиолятом Na в течение 15 мин. Для аналогичного высокого выхода стерильных растений изолята Artemis №79 было достаточно обработки ростков клубней картофеля в растворе с 7% гипохлоритом Na в течение 15 мин.

В качестве источника вирусоспецифических антигенов отдельные авторы используют каллусные культуры [174, с. 37; 252]. Получение и наращивание каллусной ткани растений с одновременным накоплением в ней вируса дает

возможность длительно сохранять материал в условиях *in vitro*, исключающих заражение другим вирусом. Кроме того, выделение вирусных антигенов из каллусной ткани позволяет получить высокоочищенные препараты ввиду отсутствия многих специфических белков, а также иметь достаточное количество антигена независимо от времени года [174, с. 37]. Исходя из этого, у инокулированных изолятом Cherie №10 растений *Nicotiana tabacum* провели индукцию каллусообразования. Через десять дней примерно 95% эксплантов индуцировали образование первичного каллуса.

При культивировании каллусной ткани (рисунок 10) проводились наблюдения за интенсивностью ее нарастания. Результаты интенсивности роста инфицированных изолятом Cherie №10 каллусных культур *N. tabacum* представлены в таблице 11.



а – Каллусные культуры *N. tabacum*, пораженные штаммом PVY^{N-Wi}; б – каллусные культуры *N. tabacum*, пораженные штаммом PVY⁰; в – каллусные культуры *N. tabacum*, пораженные различными штаммами PVY.

Рисунок 10 – Каллусные культуры *N. tabacum*, инфицированные PVY

Таблица 11 – Интенсивность роста каллусных культур *N. tabacum*

№ чашки Петри	Сырая масса 1, г	Сырая масса 2, г	Интенсивность роста, %
1	0,103	0,235	128
2	0,065	0,121	86
3	0,087	0,172	98
4	0,085	0,176	107
НСР(1%)	-	-	3,3227
m,%	-	-	0,73

Данные таблицы 11, показывают, что интенсивность нарастания каллусной ткани составляла в среднем 107% [253].

Первичный каллус пересаживали на свежие питательные среды того же состава и при нарастании каллусной массы большего объема на 3-4 неделю производили последующее пассирование. За время эксперимента было осуществлено 4 пассажа.

В результате проведенных исследований в лаборатории биотехнологии растений кафедры «Защита и карантин растений» НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина» создана коллекция местных изолятов Y-вируса картофеля, поддерживаемая в культуре изолированных органов и тканей растений (рисунок 11).



а – пробирочные растения картофеля, табака; б – культура изолированных органов и клеток *N. tabacum*

Рисунок 11 – Коллекция местных изолятов Y-вируса картофеля, поддерживаемых в культуре изолированных органов и тканей растений

Таким образом, был произведен перевод *in vitro* местных изолятов PVY, что позволит в дальнейшем иметь круглогодичный доступ к вирусным антигенам – основой для разработки отечественной иммуноферментной тест-системы.

3.4 Разработка отечественной иммуноферментной тест-системы для выявления PVY

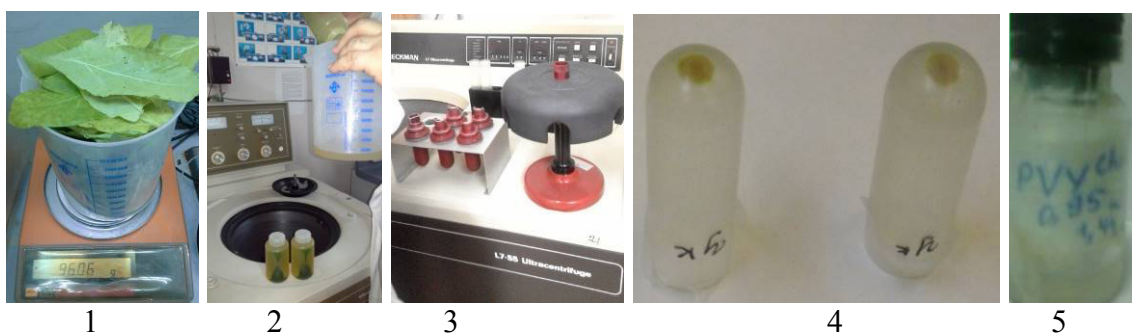
В Республике Казахстан имеется проблема острого дефицита очищенных вирусных препаратов для получения моно- и поликлональных антител, а также создаваемых на их основе диагностических тестов для обнаружения вирусных заболеваний картофеля. Наличие коллекции изолятов PVY, размножаемых в культуре ткани растений, представляющее собой доступ в любое время года, позволит упростить работу по получению поли- и моноклональных антител для создания диагностических тест-систем, и исключает зависимость от зарубежных коммерческих фирм производителей диагностикумов.

Технология получения ИФА тест-системы включает в себя следующие этапы: идентификация изолятов PVY; инокуляция тест-растений и накопление вируса; получение вирусного препарата; иммунизация лабораторных

животных; получение специфических поликлональных антител и очистка; получение конъюгатов антител; конструирование тест-системы и ее испытание.

3.4.1 Получение вирусного препарата

Из коллекции изолятов PVY, созданной на основе проведенного скрининга картофелеводческих посадок картофеля Республики Казахстан для разработки ИФА-диагностикума был выбран изолят *Cherie* №10. Листовая масса растений *Nicotiana tabacum* сорта Samsun, полученная в результате инокуляции изолятом и накопления вируса послужила для последующей очистки препарата PVY, в последующем названным PVY^{Ch} (рисунок 12).



1 – листья *N. tabacum*, зараженные PVY^{Cherie}; 2 – низкоскоростное центрифугирование; 3 – ультрацентрифугирование с Bucket-ротором SW28; 4 – осадок вирусного экстракта; 5 – высокоочищенный препарат PVY^{Ch}

Рисунок 12 – Получение высокоочищенного вирусного препарата

Процесс очистки и концентрирования вирусов весьма сложен и включает в себя физические и химические методы для устранения из сока растений, зараженных вирусом, все посторонние загрязняющие частицы [174, с. 19; 180, с. 104].

Разработанный протокол выделения вируса из растительного материала состоял из 7 этапов: 1-й этап – экстракция. Листья зараженных растений *Nicotiana tabacum* гомогенизировали с охлажденным 0,1 М калий-фосфатным буфером с 0,005 М ЭДТА 0,2% 2-меркаптоэтанола; 2-й этап – осветление с 8,5% н-бутанолом в холоде 30 мин и центрифугированием 8000 об/мин в течении 10 мин; 3-й этап – обработка детергентом 20%-Тритон-Х-100 в течении 30 мин; 4-й этап – осаждение с ПЭГ-6000 и хлоридом натрия 2 часа при 4°C и центрифугировали 20 мин при 12000 об/мин; 5-й этап – экстракция трижды с 0,1 М глициновым буфером pH 7,5 и осветление низкоскоростным центрифугированием 15 мин при 1000 об/мин при каждой экстракции; 6-й этап – ультрацентрифугирование через сахарозную подушку при 27000 об/мин 2 часа 30 мин, 12°C; 7-й этап – получение препарата вируса, экстрагировали вирус 0,1 М глициновым буфером низкоскоростным центрифугированием в течение 15 минут при 10000 об/мин.

В процессе очистки методом ультрацентрифугирования с каждым этапом содержание вируса в исследуемом экстракте существенно снижалось, что

соответствует литературным данным [180, с. 112]. Наибольшие потери происходили на этапах осветления и после экстракции вируса, осажденного ПЭГ. В то же время, концентрация вируса на последних этапах очистки значительно увеличивалась в результате многократного уменьшения объема экстракта. В ходе конечного этапа суспендирования и низкоскоростного центрифугирования из осадка после сахарозной подушки вирусный препарат сканировали на спектрофотометре Smart Spec Plus в диапазоне длин волн 240-360 нм. Полученные результаты показали, что препарат имеет типичный для нитевидных РНК-содержащих потивирусов спектр поглощения с локальным минимумом при 191 нм и локальным максимумом при 276 нм. Концентрация вирусного антигена составила 1,9 мг/мл, после добавления равного объема глицерина концентрация препарата составила 0,95 мг/мл. Полученный препарат PVY^{Ch} изучали в прямом варианте ИФА (рисунок 13) в сравнении с положительным контролем (коммерческий очищенный вирус PVY^O , концентрация 2,2 мг/мл), полученным ранее препаратом [254] из каллусных культур *N. tabacum* PVY^{Ch-1} (концентрация 0,4 мг/мл).

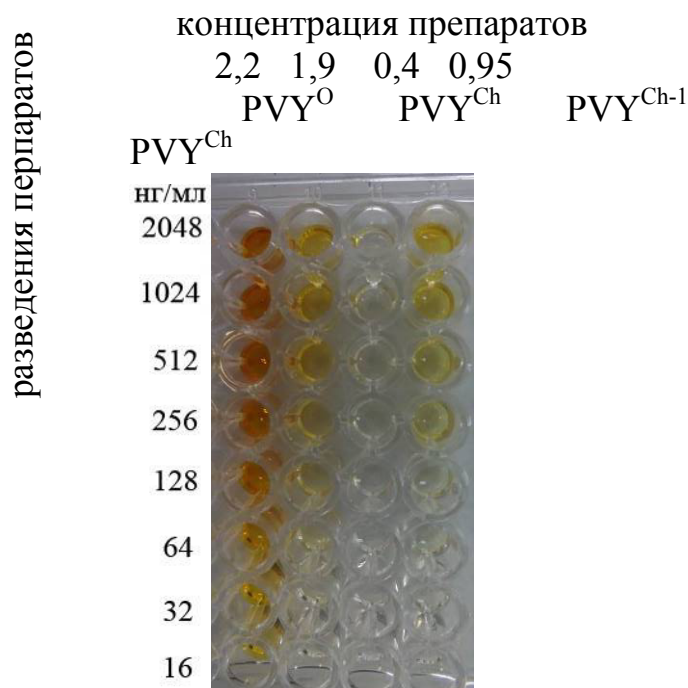


Рисунок 13 – Исследование полученного препарата PVY^{Ch} в ИФА титрованием антигена

В соответствии с рисунком 15, препарат из листового материала *N. tabacum* имел более высокий титр и концентрацию антигена, чем препарат, очищенный из каллусных культур. Полученные результаты свидетельствуют о том, что очистка препаратов из каллусных тканей является малоэффективной по сравнению с препаратами, из листьев растений-накопителей. Препараты изолята PVY^{Ch} , характеризовались высокой степенью чистоты (A_{260}/A_{280} 1,21-1,25) и сохраняли высокую иммунологическую активность по результатам ИФА. Выход препарата PVY^{Ch} из 125 г. листьев *N. tabacum* составил 1,9 мг/мл,

в отличие от 0,4 мг/мл, очищенного из 97 г каллуса данного растения-накопителя (A_{260}/A_{280} 1,2) [255].

На заключительном этапе методом перекрестного тестирования полученный вирусный препарат PVY^{Ch} проверялся на специфичность к антителам других вирусов картофеля: PVS, PLRV, PVM, PVX, PVA. Результаты исследований показали, что полученный препарат реагировал строго со специфичными к PVY антителами.

Таким образом, на основе изолята Cherie №10 был получен высокоочищенный антигеноактивный вирусный препарат для дальнейшей работы по иммунизации лабораторных животных и получения специфических поликлональных антител – основных реагентов создаваемой тест-системы ИФА.

3.4.2 Получение специфических поликлональных антител

Иммунизация в лабораторных условиях начинается с введения в организм подопытного животного очищенного препарата фитовируса. Оптимальный способ иммунизации зависит от природы иммуногена, вида подопытного животного и цели, которой будет служить антисыворотка [174, с. 51].

Для получения гипериммунных антисывороток проводили иммунизацию лабораторных кроликов (рисунок 14) препаратом PVY^{Ch} по двум схемам (А и Б), описанным в методической части.



а – подкожная иммунизация кролика вдоль позвоночника вирусным препаратом; б – подкожная иммунизация кролика вирусным препаратом в 3-4 точки вдоль позвоночника

Рисунок 14 – Подкожная иммунизация кролика вирусным препаратом

Для более широкого изучения иммуногенных свойств препарата PVY^{Ch} проводили также иммунизацию лабораторных белых мышей по трем схемам. В результате тестирования в непрямом ИФА у подопытных животных был зафиксирован иммунный ответ, выражающийся в синтезе специфических иммуноглобулинов в титрах, представленных в таблице 12.

Таблица 12 – Титры антисывороток лабораторных животных к PVY в непрямом варианте ИФА при A₄₉₂

Схема иммунизации	Вид животного	Титр антисыворотки, +/-															
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800	1:25600	1:51200	1:102400	1:204800	1:409600	1:819200	1:1638400	1:3276800
Схема А	Кролик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Схема Б	Кролик	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Схема В	Мышь	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Схема Г	Мышь	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Схема Д	Мышь	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Как видно из таблицы 12, полученные кроличьи антисыворотки характеризовались высоким специфическим титром 1:819 200 – 1:1 638 400 в непрямом варианте ИФА, в отличие от мышинных антител, реагирующих с антигеном с титром не превышающим 1:12800.

В дальнейших исследованиях с целью получения антител была использована кроличья антисыворотка с максимальным титром (1:1638400, схема Б).

Важными показателями качества антисывороток и очищенных препаратов антител являются специфический, неспецифический и гетерологичный титры. Специфическим титром называется титр к целевому антигену, неспецифическим – к белкам растения [174, с. 24] (в наших исследованиях к белкам картофеля). Гетерологичным является титр к нецелевым антигенам, например, к другим вирусам картофеля. Для проверки выбранной кроличьей антисыворотки на неспецифическую реакцию применяли гетерологичные вирусные антигены в концентрации 1 мкг/мл проводили титрование антисыворотки в непрямом ИФА. В качестве гетерологичных антигенов использовали два вируса: выделенный из растений томата PVM (изолят "Шагалалы") из коллекции АО «КАТУ им. С. Сейфуллина», положительный контроль PLRV в сравнении с гомологичными антигенами, полученному из растений *N. tabacum* (препарат PVY^N) из коллекции ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, а также PVY^{Ch} (таблица 13).

Таблица 13 – Изучение кроличьей антисыворотки в реакции на неспецифический титр, непрямой ИФА

Титр антисыворотки с антигенами				
Сок безвирусного растения <i>S. tuberosum</i> (контроль)	PVY ^{Ch}	PVY ^N	PVM	PLRV
1:100	1:1638400	1:819200	1:400	1:200

Данные таблицы 13 свидетельствуют о том, что специфический титр кроличьей антисыворотки PVY^{Ch} превышал гетерологичные титры в 200-400 раз. Специфический титр был выше неспецифического более чем в 1600 раз, что свидетельствует о высокой степени достоверности результатов диагностики Y-вируса картофеля, при использовании антисыворотки PVY^{Ch} [256].

Далее, полученные поликлональные антитела, были подвергнуты очистке методом аффинной хроматографии с использованием в качестве лиганда сефарозы (рисунок 15), осаждение иммуноглобулинов проводилось методом фракционирования (высаливания) в насыщенном растворе сульфата аммония.



Рисунок 15 – Очистка полученных поликлональных антител

Далее часть иммуноглобулинов, используемых как покровные антитела, консервировали в 50% глицерине и хранили при - 18°C, а другую часть конъюгировали с высокоочищенной пероксидазой хрена методом периодатного окисления [224, с. 12].

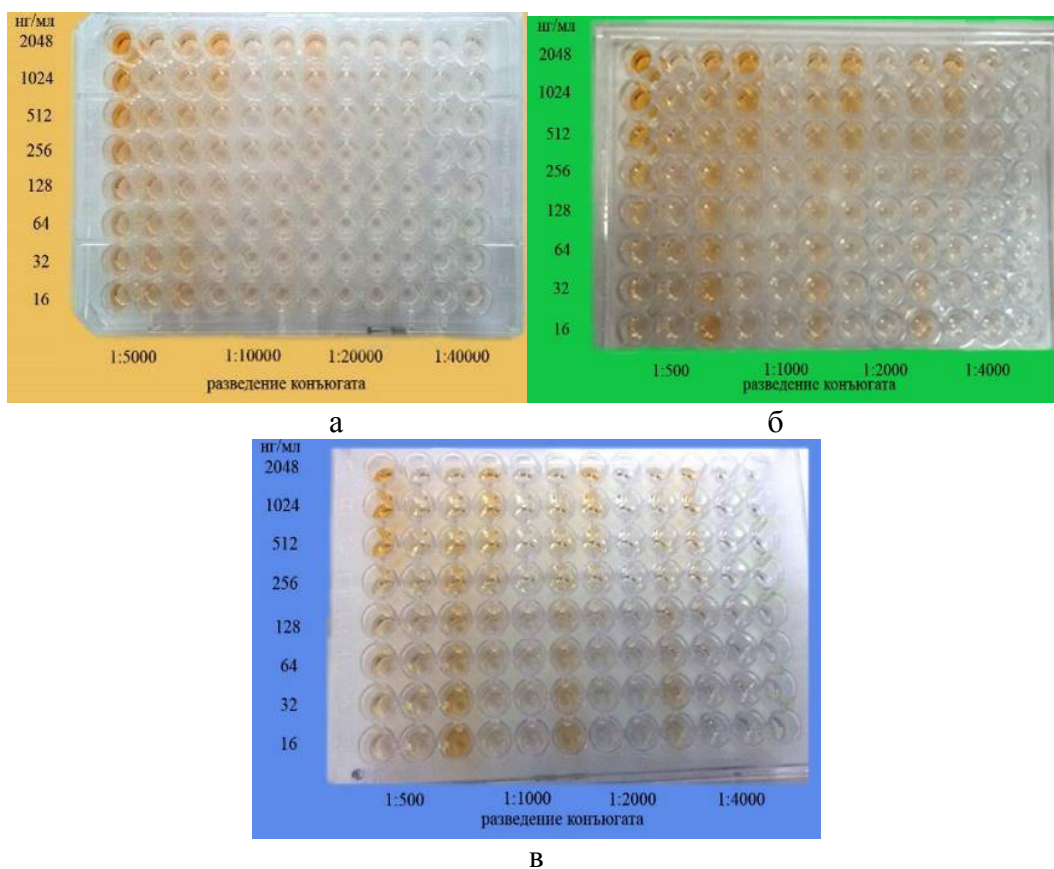
3.4.3 Конструирование иммуноферментной тест-системы для диагностики PVY и ее испытание

На заключительном этапе разработки тест-системы устанавливали оптимальное (рабочее) разведение полученных конъюгатов и антител на полистерольных планшетах различных фирм.

Специфические части использовались в трех вариантах, названных нами тест-система-1, тест система-2 и тест-система-3, для которых использовались разные разведения конъюгатов. В качестве хромогенного компонента субстратной смеси во всех тест-системах применялся орто-фенилендиамин. Измерение оптической плотности (A₄₉₂) в ячейках планшетов проводили при 492 нм для ОФД после добавления стоп-реагента.

В тест-системе-1 использовались высокосорбционные планшеты фирмы Greiner, Германия (Bio-one, Microlon HB). В тест-системе-2 использовались среднесорбционные планшеты российского производства Санкт-

петербургского завода медпрепаратов (ОАО «Фирма Медполимер»). В тест-системе-3 использовались среднесорбционные планшеты итальянского производства («ALTO»). Результаты подбора оптимального конъюгата к PVY^{Ch} указаны на рисунке 16.



а - планшеты высокосорбционные «Bio-1, Greiner, Германия» (тест-система-1); б - планшеты среднесорбционные «Медполимер», Россия; (тест-система-2); в - планшеты среднесорбционные «ALTO», Италия (тест-система-3)

Рисунок 16 – Подбор оптимального разведения конъюгата к PVY^{Ch}

Проведенные исследования показали, что оптимальным (рабочим) разведением конъюгатов с добавлением стоп-реагента для тест-системы-1 являлось разведение 1:20000, для тест-системы-2 – 1:2000 и тест-системы-3 – 1:2000.

Далее, аналогично устанавливали оптимальное (рабочее) разведение полученных антител. Специфические части также использовались в трех вариантах (тест-система-1, тест система-2 и тест-система-3), для которых использовались разные разведения антител. В качестве хромогенного компонента субстратной смеси во всех тест-системах применялся орто-фенилендиамин. Измерение оптической плотности (A₄₉₂) в ячейках планшетов проводили при 492 нм для ОФД после добавления стоп-реагента.

Проведенные исследования показали, что оптимальным (рабочим) разведением антител для тест-системы-1 является разведение 2 мкг/мл, для тест-системы-2 – 2 мкг/мл и тест-системы-3 – 4 мкг/мл.

С целью изучения чувствительности созданной на основе препарата PVY^{Ch} тест-системы определяли способность реагировать на различные штаммы PVY. При этом применяли разведения высокоочищенных вирусных препаратов от 1000 нг/мл до 1 нг/мл (таблица 14).

Таблица 14 – Определение чувствительности выявления различных штаммов PVY разработанным диагностикумом в «сэндвич»-варианте ИФА

Штамм вируса	Концентрация вируса, нг/мл										
	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
PVY ^O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PVY ^{NTN}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
NC	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

По представленным в таблице 14 результатам исследований, чувствительность анализа на PVY^O и PVY^{NTN} при тестировании иммуноспецифическими реагентами (антитела и конъюгаты), полученными на основе препарата PVY^{Ch} составила 1 и 2 нг/мл соответственно.

В проводимых исследованиях дополнительно изучали способность разработанного диагностикума выявлять различные штаммы PVY в растительном материале. В эксперименте использовали растения табака, зараженные PVY^O и PVY^{N-NTN} штаммами из коллекции ФГБНУ Всероссийского НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха (ФГБНУ ВНИИКХ), растения-регенеранты *N. tabacum*, зараженные изолятом Cherie №10, а также положительные контроли фирмы Agdia (США) на некротический PVY^N, PVY^C, а также PVY^{C+O}. Следует отметить, что разведение лиофилизированных коммерческих положительных контролей осуществлялось согласно инструкции производителя (2 мл буферного раствора на 1 флакон с лиофилизатом). Приготовление положительных контролей из *N. tabacum*, содержащих различные штаммы, проводилось из расчета: на 1 мл буфера для проб и конъюгатов 0,1 г листовой ткани. Результаты тестирования различных штаммов PVY с помощью разработанного диагностикума в сравнении с коммерческими аналогами представлены в таблице 15.

Как видно из таблицы 15, аналогично реакции с очищенными вирусными препаратами, изучаемый диагностикум был наиболее чувствителен к PVY^O, что в 4 раза превышало реакцию на растительные образцы со штаммом PVY^{N-NTN}. Все исследуемые положительные контроли на штаммы PVY^C, PVY^{O+C}, PVY^N уступали обнаружению PVY^O в 2 раза.

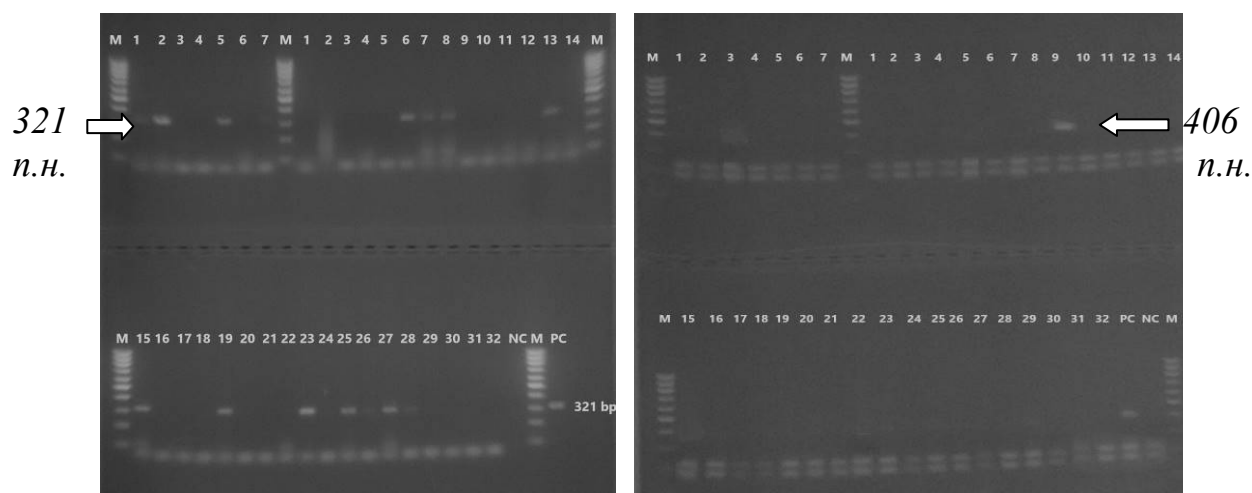
Таблица 15 – Результаты тестирования различных штаммов PVY с помощью разработанного диагностикума в сравнении с коммерческими аналогами

Пробы со штаммами PVY	Разведение сока листьев табака (положительных/отрицательных контролей)																
	Native	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192	1:16384	1:32768	1:26552
PVY ^C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PVY ^{O+C}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PVY ^N	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
PVY ^{N-NTN}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Cherie №10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PVY ^O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
NC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, использование иммуноферментного диагностикума [257], разработанного на основе вирусного препарата, полученного из изолята Cherie №10 в практике безвирусного семеноводства картофеля позволит эффективно выявлять основные группы штаммов PVY.

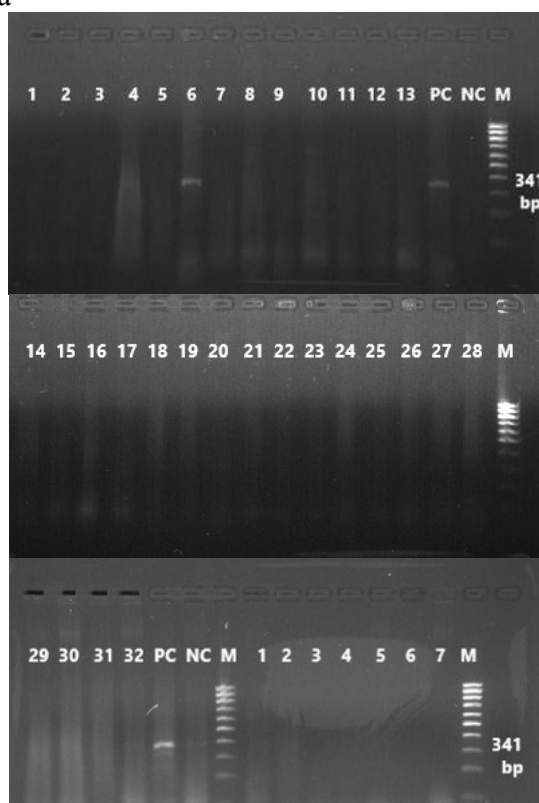
3.5 Оценка на вирусоустойчивость сортов картофеля

В настоящее время обширный объем генетических ресурсов картофеля содержит доминантные аллели генов *Ry-and*, *Ry-sto* и *Ry-chc*, однако литературные данные о наличии устойчивости к PVY для многих сортов картофеля либо отсутствуют, либо являются крайне неудовлетворительными, так как в подавляющем большинстве случаев приведенные характеристики основаны на субъективных результатах визуальных наблюдений за растениями картофеля. На сегодняшний день, для быстрой идентификации аллелей генов, обеспечивающих экстремальную устойчивость к PVY, успешно применяется метод молекулярно-генетического анализа [258-261]. В этой связи, на данном этапе экспериментов, был проведен молекулярный скрининг отечественного селекционно-генетического материала картофеля и фенотипическая оценка его устойчивости к PVY. Результаты скрининга генотипов картофеля казахстанской селекции на наличие молекулярных маркеров, сцепленных с генами экстремальной устойчивости к PVY, представлены на рисунках 17, 18, 19 и-20 и обобщены в таблице 16.



а

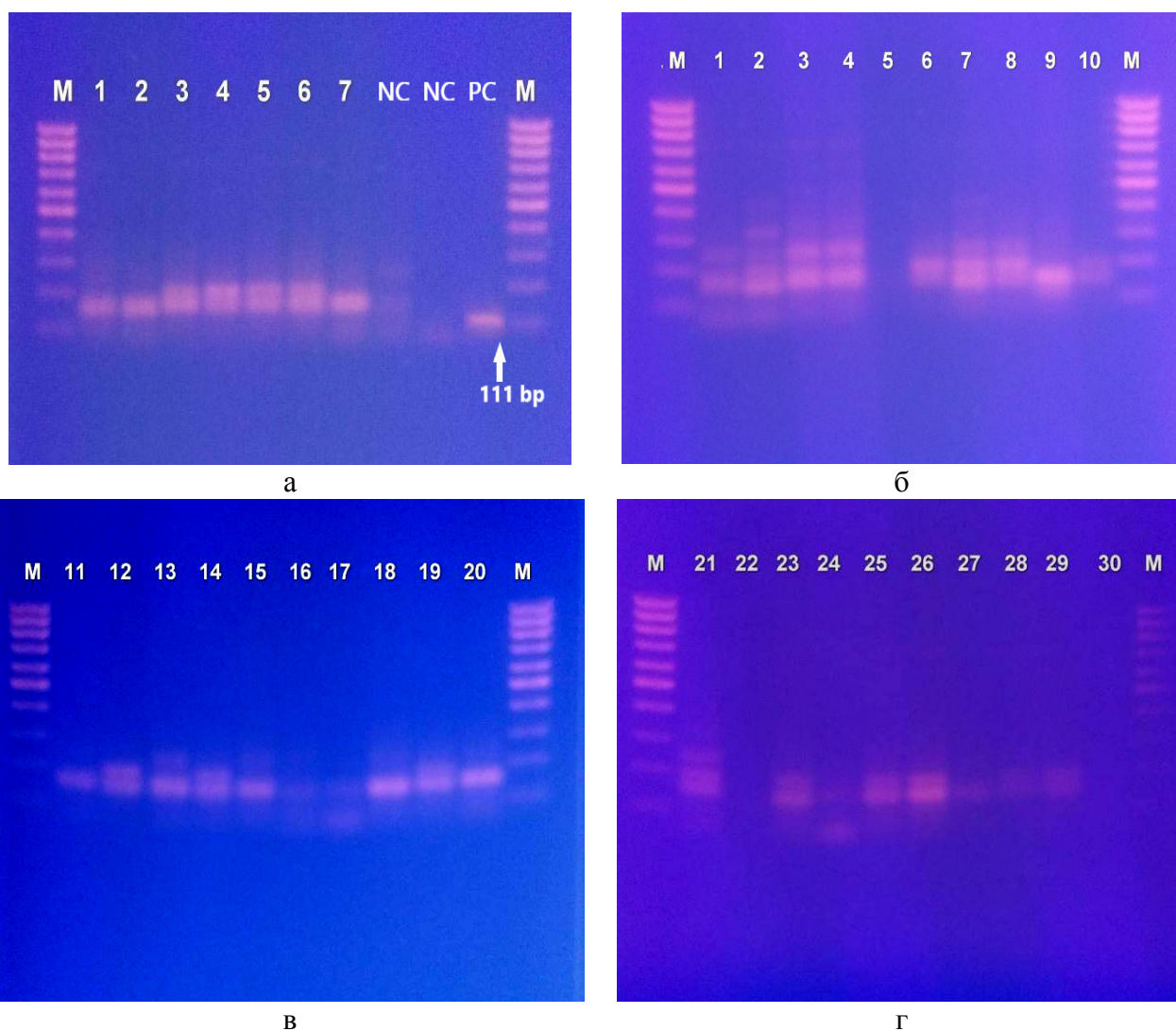
б



в

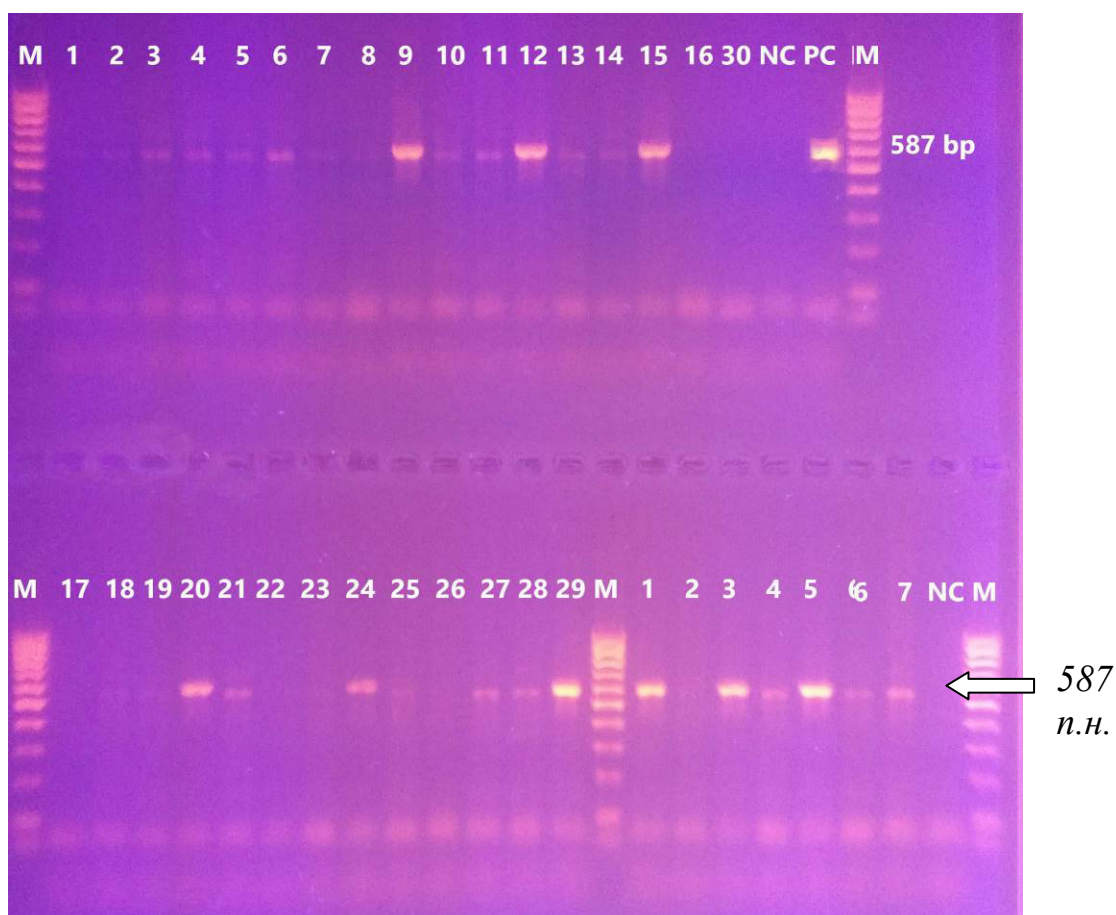
а – RYSC3; б – GP122-406; в – YES3-3A: селекционные линии картофеля: 1 – 15 с-ц 7П41 х Добро, 2 – 23 с-ц 1069 х Адретта, 3 – 62.211.108.5 с-ц Тамата х Ягодный-19с, 4 – 1.84.68 с-ц 10 х Ягодный-19, 5 – 10.28 Лазарь х Алая Заря, 6 – Лазарь х Весна, 7 – 53 с-ц 52-99; сорта картофеля: 1 – Жанайсан, 2 – Бабаев, 3 – Улан, 4 – Аксор, 5 – Памяти Конева, 6 – Ушконыр, 7 – Шаггалалы, 8 – Альянс, 9 – Карасайский, 10 – Ильин, 11 – Нэрли, 12 – Тохтар, 13 – Мирас, 14 – Алый парус, 15 – Тустеп, 16 – Алая заря, 17 – Алая заря -2, 18 – Вид-2, 19 – Вид-1, 20 – Артем, 21 – Дуняша, 22 – Адиль, 23 – Бакша, 24 – Удовицкий, 25 – Валерий, 26 – Лина Костаная, 27 – Костанайские новости, 28 – Курант-1, 29 – Мечта Красавина, 30 – Тэрра-1, 31 – Акжар, 32 – Ягодный-19. М — Молекулярный маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder UAB. NC – Отрицательный контроль. PC – позитивный контроль

Рисунок 17 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации маркеров RYSC3, GP122-406 и YES3-3A



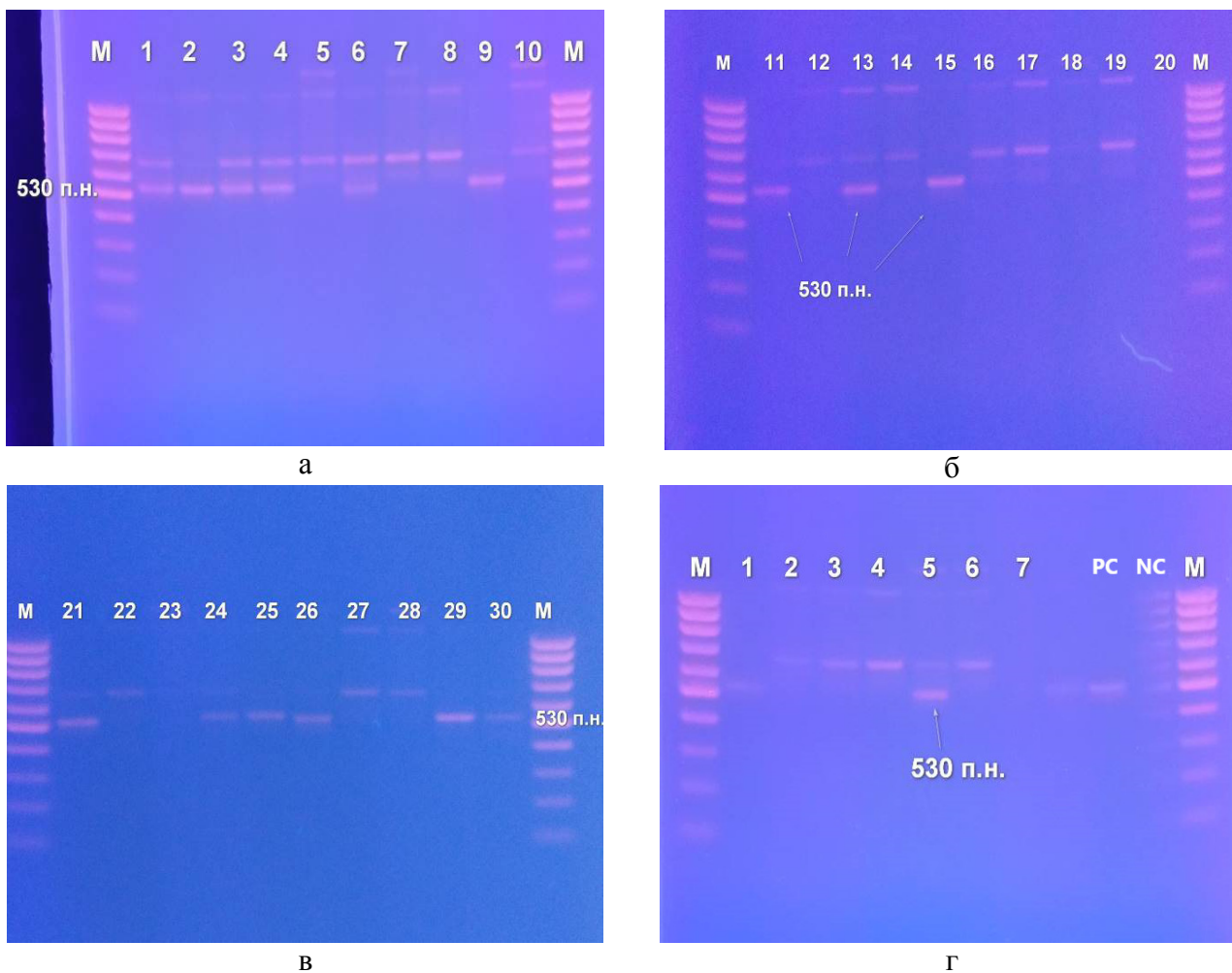
а – селекционные линии картофеля, NC, PC; б – образцы сортов №1-10; в - образцы сортов №11-20; г - образцы сортов №21-30. Селекционные линии картофеля: 1 – 15 с-ц 7П41 х Добро, 2 – 23 с-ц 1069 х Адретта, 3 – 62.211.108.5 с-ц Тамата х Ягодный-19с, 4 – 1.84.68 с-ц 10 х Ягодный-19, 5 – 10.28 Лазарь х Алая Заря, 6 – Лазарь х Весна, 7 – 53 с-ц 52-99; сорта картофеля: 1 – Жанайсан, 2 – Бабаев, 3 – Улан, 4 – Аксор, 5 – Памяти Конева, 6 – Ушконец, 7 – Шагалалы, 8 – Альянс, 9 – Карасайский, 10 – Ильин, 11 – Нэрли, 12 – Тохтар, 13 – Мирас, 14 – Алый парус, 15 – Тустеп, 16 – Алая заря, 17 – Алая заря -2, 18 – Вид-2, 19 – Вид-1, 20 – Артем, 21 – Дуняша, 22 – Адиль, 23 – Бакша, 24 – Удовицкий, 25 – Валерий, 26 – Лина Костаная, 27 – Костанайские новости, 28 – Курант-1, 29 – Мечта Красавина, 30 – Ягодный-19. М — Молекулярный маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder UAB. NC – Отрицательный контроль. PC – позитивный контроль

Рисунок 18 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации маркера STM003



Сорта картофеля: 1 – Жанайсан, 2 – Бабаев, 3 – Улан, 4 – Аксор, 5 – Памяти Конева, 6 – Ушконыр, 7 – Шаггалалы, 8 – Альянс, 9 – Карасайский, 10 – Ильин, 11 – Нэрли, 12 – Тохтар, 13 – Мирас, 14 – Алый парус, 15 – Тустеп, 17 – Алая заря -2, 18 – Вид-2, 19 – Вид-1, 20 – Артем, 21 – Дуняша, 22 – Адиль, 23 – Бакша, 24 – Удовицкий, 25 – Валерий, 26 – Лина Костаная, 27 – Костанайские новости, 28 – Курант-1, 29 – Мечта Красавина; селекционные линии картофеля: 1 – 15 с-ц 7П41 х Добро, 2 – 23 с-ц 1069 х Адретта, 3 – 62.211.108.5 с-ц Тамата х Ягодный-19с, 4 – 1.84.68 с-ц 10 х Ягодный-19, 5 – 10.28 Лазарь х Алая Заря, 6 – Лазарь х Весна, 7 – 53 с-ц 52-99. М — Молекулярный маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder UAB. NC – Отрицательный контроль. PC – позитивный контроль

Рисунок 19 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации маркера Ry186



а – образцы сортов № 1-10; б - образцы сортов № 11-20 ; в - образцы сортов №21-30; г - селекционные линии картофеля, NC, PC. Сорта картофеля: 1 – Жанайсан, 2 – Бабаев, 3 – Улан, 4 –Аксор, 5 – Памяти Конева, 6 – Ушкoныр, 7 – Шагaлaлы, 8 – Aльянc, 9 – Карасайский, 10 – Ильин, 11 – Нэрли, 12 – Тохтар, 13 – Мирас, 14 – Aльий парус, 15 – Тустеп, 16 – Aлая зря, 17 – Aлая зря -2, 18 – Вид-2 , 19 – Вид-1, 20 – Артем, 21 – Дуныша, 22 – Адиль, 23 – Бакша, 24 – Удовицкий, 25 – Валерий, 26 – Лина Костаная, 27 – Костанайские новости, 28 – Курант-1, 29 – Мечта Красавина, 30 – Ягодный-19; селекционные линии картофеля: 1 – 15 с-ц 7П41 x Добро, 2 – 23 с-ц 1069 x Адретта, 3 – 62.211.108.5 с-ц Тамата x Ягодный-19с, 4 – 1.84.68 с-ц 10 x Ягодный-19, 5 – 10.28 Лазарь x Aлая Зря, 6 – Лазарь x Весна, 7 – 53 с-ц 52-99. М – Молекулярный маркер GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder UAB. NC – Отрицательный контроль. PC – позитивный контроль

Рисунок 20 – Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации маркера PVY38-530

Таблица 16 – Оценка генетических ресурсов картофеля на наличие молекулярных маркеров устойчивости к PVY

Образец	ДНК-маркер/ген						
	RYSC3	GP122-406	YES3-3A	STM003	Ry186	PVY38-530	S1d11
	<i>Ry-and</i>	<i>Ry-fsto</i>	<i>Ry-sto</i>		<i>Ry-cha</i>		<i>Ny-1</i>
1	2	3	4	5	6	7	8
Акжар	-	-	-	-	-	-	-
Алая заря	-	-	-	-	-	-	-
Алая заря-2	-	-	-	-	-	+	-
Валерий	+	-	-	-	-	+	-
Вид-1	+	-	-	-	-	-	-
Вид-2	-	-	-	-	-	-	-
Дуняша	-	-	-	-	-	+	-
Костанайские новости	+	-	-	-	-	-	-
Курант-1	+	-	-	-	-	-	-
Тустеп	+	-	-	-	-	+	-
Удовицкий	-	-	-	-	+	+	-
Аксор	-	-	-	-	-	+	-
Альянс	+	-	-	-	-	-	-
Бабаев	-	-	-	-	-	+	-
Жанайсан	-	-	-	-	-	+	-
Ильин	-	-	-	-	-	-	-
Карасайский	-	+	-	-	+	+	-
Мирас	+	-	-	-	-	+	-
Нэрли	-	-	-	-	-	+	-
Памяти Конаева	-	-	-	-	-	-	-
Тохтар	-	-	-	-	+	-	-
Улан	-	-	-	-	-	+	-
Ушконыр	+	-	+	-	-	+	-
Шагалалы	+	-	-	-	-	-	-
15 с-ц 7П41 х Добро	+	-	-	-	+	-	-
62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19с	-	-	-	-	+	-	-
10.28 Лазарь х Алая Заря	+	-	-	-	+	+	-
23 с-ц 1069 х Адретта	+	-	-	-	-	-	-
53 с-ц 52-99	-	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 16

1	2	3	4	5	6	7	8
2-94-06	-	-	-	-	-	-	-
1-98-02	-	-	-	-	-	-	-
12-07-03	-	-	-	-	-	-	-
4-08-02	-	-	-	-	-	-	-
27-10-03	-	-	-	-	-	-	-
9-07-12	-	-	-	-	-	-	-
32-07-01	-	-	-	-	-	-	-
Примечания:							
1. «+» – наличие признака.							
2. «-» – отсутствие признака							

Молекулярный маркер RYSC3, нацеленный на поиск доминантного аллеля гена *Ry-and*, был выявлен в генетическом материале 12 образцов картофеля: Валерий, Вид-1, Костанайские новости, Курант-1, Тустеп, Альянс, Мирас, Ушконыр, Шагалалы, 15 с-ц 7П41 х Добро, 10.28 Лазарь х Алая Заря и 23 с-ц 1069 х Адретта. Маркер PVY38-530 был детектирован в геноме 14 образцов картофеля: Алая заря-2, Валерий, Дуняша, Тустеп, Удовицкий, Аксор, Бабаев, Жанайсан, Карасайский, Мирас, Нэрли, Улан, Ушконыр и 10.28 Лазарь х Алая Заря. В генетическом материале шести образцов картофеля Карасайский, Тохтар, Удовицкий, 15 с-ц 7П41 х Добро, 62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19с, 10.28 Лазарь х Алая Заря обнаружен ДНК-маркер Ry186, который направлен на детекцию доминантного аллеля гена *Ry-chc*. Комплексное присутствие ДНК-маркера RYSC3 и PVY38-530 обнаружено у сортов Валерий, Мирас, Тустеп и Ушконыр, а также у гибрида 10.28 Лазарь х Алая Заря. Одновременно три молекулярных маркера: Ry186, PVY38-530 и GP122-406, направленный на поиск *Ry-fsto* в комплексе было обнаружено только у сорта Карасайский. ДНК маркер YES3-3A, нацеленный на выявление гена *Ry-sto*, был обнаружен лишь у сорта Ушконыр, который также имел в комплексе маркеры RYSC3 и PVY38-530. Молекулярные маркеры S1d11 и STM003, направленные на поиск генов *N-1* и *Ry-sto* соответственно, не выявлены ни у одного из исследованных образцов, что, предположительно, свидетельствует о том, что геном вида *S. stoloniferum* не был вовлечен в процесс создания этих сортов (Приложение Д). В генетическом материале 13 образцов картофеля: Акжар, Алая заря, Альянс, Вид-2, Ильин, Памяти Конаева, 53 с-ц 52-99, 2-94-06, 1-9802, 12-07-03, 4-08-02, 27-10-03, 9-07-12, 32-07-01, 15-08-03 не был детектирован ни один из диагностируемых молекулярных маркеров.

При изучении вирусоустойчивости картофеля важно иметь незагрязненный другими примесями инокулюм, содержать инокулируемые растения в изолированных от других патогенов условиях и соблюдать оптимальные факторы культивирования. В этой связи для фенотипической

оценки степени устойчивости изучаемых сортов к PVY нами были отобраны, свободные от вирусной инфекции сортообразцы картофеля (таблица 17).

Таблица 17 – Результаты поиска здоровых клонов картофеля отечественной селекции методом ИФА

Образец, сорт / гибрид	Кол-во проб, шт	Зараженных вирусами, шт.						Здоровых, шт
		PVX	PVY	PVS	PVM	PLRV	PVA	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Акжар	30	18	0	24	27	24	6	3
Аксор	30	0	0	2	5	1	0	25
Адиль	30	8	9	15	19	6	0	11
Алая заря	30	21	6	18	6	23	3	7
Алая заря-2	30	13	7	10	18	9	0	12
Альянс	30	11	8	12	14	8	3	16
Артем	30	20	0	18	9	21	6	9
Бабаев	30	12	20	12	20	12	12	10
Валерий	30	9	0	3	27	27	0	3
Вид-1	30	13	10	16	21	13	5	9
Вид-2	30	14	15	18	22	10	4	8
Дуняша	30	27	21	18	24	20	9	3
Жанайсан	30	0	0	23	23	0	0	7
Ильин	30	10	10	5	25	10	15	5
Костанайские новости	30	18	12	15	22	21	6	8
Карасайский	30	0	0	19	19	0	0	11
Курант-1	30	17	20	24	24	10	2	6
Лина Костаная	30	27	24	20	24	18	12	3
Мечта Красавина	30	19	20	18	21	11	4	9
Мирас	30	12	10	14	17	3	0	13
Нэрли	30	1	3	3	2	5	0	25
Памяти Конаева	30	18	19	17	20	7	2	10
Тохтар	30	18	16	18	23	15	0	7
Тустеп	30	12	0	15	21	9	3	9
Удовицкий	30	15	9	18	15	21	18	9
Улан	30	10	15	10	5	20	10	10
Ушконыр	30	4	4	16	23	0	0	7
Шагалалы	30	0	5	13	16	4	0	14
Ягодный-19	30	12	0	24	27	24	3	3
15 с-ц 7П41 х Добро	30	10	7	20	22	9	0	8
62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19	30	9	3	10	9	3	0	11
10.28 Лазарь х Алая Заря	30	12	6	11	13	2	0	7

Продолжение таблицы 17

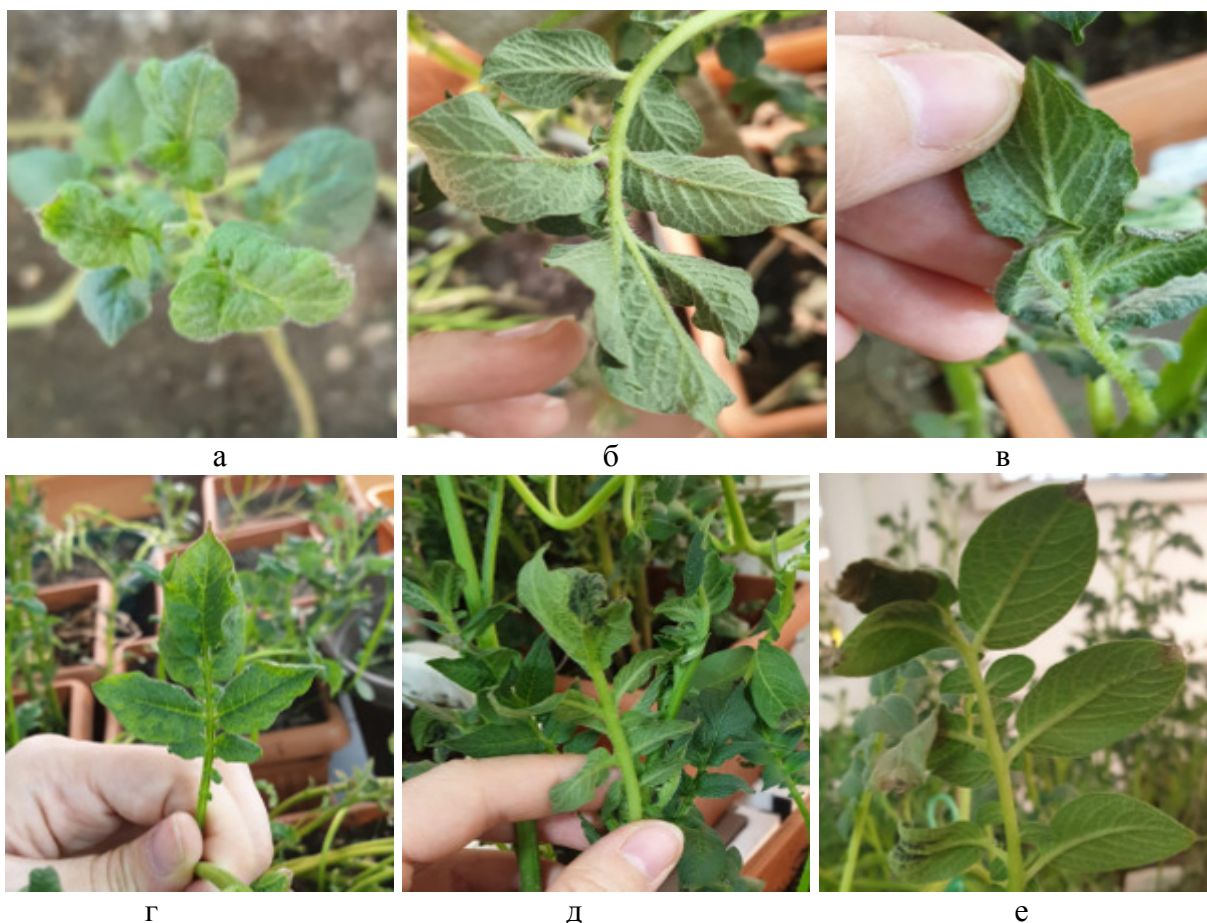
1	2	3	4	5	6	7	8	9
23 с-ц 1069 х Адретта	30	8	5	9	12	1	0	11
53 с-ц 52-99	30	10	9	8	7	0	2	9
2-94-06	30	5	8	16	20	3	0	6
1-98-02	30	3	6	12	16	2	1	7
12-07-03	30	4	3	10	9	0	0	10
4-08-02	30	8	4	14	14	6	0	5
27-10-03	30	6	7	19	13	2	3	8
9-07-12	30	4	2	16	19	1	0	6
32-07-01	30	5	9	9	18	0	2	9
15-08-03	30	2	1	13	17	3	0	7

Согласно представленным в таблице 17 данным, свободные от исследуемых вирусов пробы картофеля были отобраны и высажены в теплице (рисунок 21) для размножения и получения безвирусного клубневого материала с целью дальнейшего изучения на вирусоустойчивость.



Рисунок 21 – Выращивание безвирусных клонов картофеля в теплице

Для определения уровня устойчивости селекционных образцов картофеля к PVY было проведено искусственное инфицирование растений вирусом в регулируемых условиях фитотрона. Оценку проводили путем визуального наблюдения симптомов на инокулированных растениях картофеля, а также с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). На 25-30-е сутки после инокуляции сортов картофеля были отмечены различные симптомы на листьях большинства сортов картофеля, проявляющиеся в основном в виде слабой мозаики и некрозов листовой ткани (рисунок 22).



а – мечта Красавина; б – Тохтар; в – памяти Конаева; г – Курант-1; д – Аксор; е – Нэрли

Рисунок 22 – Симптомы поражения PVY на листьях *Solanum tuberosum*

Фенотипическая оценка степени устойчивости изучаемых сортов к PVY отражена в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты искусственного инфицирования растений картофеля PVY

Образец	Реакция растений	Результат ИФА			Наличие маркера	Устойчивость к PVY
		X Ao, о.е.	Ao/A	P		
1	2	3	4	5	6	7
Акжар	S: lm	0,224	7,50	++	-	Не устойчив
Аксор	n/s	0,094	2,08	-	PVY38-530	Устойчив
Адиль	S: lm	0,213	7,04	++	-	Не устойчив
Алая заря	S: lm	0,198	6,42	++	-	Не устойчив
Алая заря-2	n/s	0,099	2,29	-	PVY38-530	Устойчив
Альянс	L: ln	0,080	1,50	-	RYSC 3	Устойчив
Артем	n/s	0,091	1,96	-	Ry 186	Устойчив
Бабаев	L: ln	0,138	3,92	+	PVY38-530	Слабо восприимчив

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7
Валерий	n/s	0,082	1,58	-	PVY38-530, RYSC3	Устойчив
Вид-1	n/s	0,109	2,71	-	RYSC 3	Устойчив
Вид-2	L: ln	0,145	4,21	+	-	Слабо восприимчив
Дуняша	S: lm	0,209	6,88	++	PVY38-530	Не устойчив
Жанайсан	n/s	0,074	1,25	-	PVY38-530	Устойчив
Ильин	n/s	0,197	6,38	++	-	Не устойчив
Костанайские новости	n/s	0,094	2,08	-	RYSC 3	Устойчив
Карасайский	L: ln	0,120	3,17	+	PVY38-530, GP 122 406, Ry 186	Слабо восприимчив
Курант-1	S: lm	0,333	12,04	++	RYSC 3	Не устойчив
Лина Костаная	L: ln	0,124	3,33	+	PVY38-530	Слабо восприимчив
Мечта Красавина	S: lm	0,127	3,46	+	PVY38-530, Ry 186	Слабо восприимчив
Мирас	L: ln	0,067	0,96	-	PVY38-530, RYSC3	Устойчив
Нэрли	L: ln	0,079	1,46	-	PVY38-530	Устойчив
Памяти Конаева	n/s	0,100	2,33	-	-	Устойчив
Тохтар	L: ln	0,138	3,92	+	Ry 186	Слабо восприимчив
Тустеп	L: ln	0,134	3,75	+	PVY38-530, RYSC 3, Ry 186	Слабо восприимчив
Удовицкий	L: ln	0,127	3,46	+	PVY38-530, Ry 186	Слабо восприимчив
Улан	L: ln	0,094	2,08	-	PVY38-530	Устойчив
Ушконыр	L: ln	0,091	1,96	-	PVY38-530, RYSC3, YES3-3A	Устойчив
Шагалалы	L: ln	0,108	2,67	-	RYSC 3	Устойчив
Ягодный-19	S: lm	0,136	3,83	+	PVY38-530	Слабо восприимчив
15 с-ц 7П41 х Добро	n/s	0,091	1,96	-	RYSC 3, Ry 186	Устойчив
62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19с	L: ln	0,328	11,83	++	Ry 186	Не устойчив
10.28 Лазарь х Алая Заря	L: ln	0,218	7,25	++	PVY38-530, RYSC 3, Ry 186	Не устойчив
23 с-ц 1069 х Адретта	n/s	0,100	2,33	-	RYSC 3	Устойчив

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6	7
53 с-ц 52-99	L: ln	0,104	2,50	-	-	Устойчив
2-94-06	S: lm	0,290	10,25	++	-	Не устойчив
1-98-02	L: ln	0,273	9,54	++	-	Не устойчив
12-07-03	L: ln	0,131	3,63	+	-	Слабо восприимчив
4-08-02	L: ln	0,107	2,63	-	-	Устойчив
27-10-03	L: ln	0,089	1,88	-	-	Устойчив
9-07-12	S: lm	0,112	2,83	-	-	Устойчив
32-07-01	n/s	0,128	3,50	+	-	Слабо восприимчив
15-08-03	L: ln	0,090	1,92	-	-	Устойчив
<p>Примечания:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. S – системная реакция. 2. L – локальная реакция. 3. lm – мозаика листьев. 4. ln –некротизация листовой ткани. 5. n/s – отсутствие симптомов. 6. «+++» – положительная реакция. 7. «+» – слабоположительная реакция. 8. «-» – отрицательная реакция. 9. РС (ИФА) – 0,137 о.е. 10. NS (ИФА) – 0,044 о.е 						

При оценке клубневого материала у исследуемых сортов картофеля симптомов PTNRD не установлено.

Сорта Адиль, Акжар, Алая заря, Дуняша, Курант-1 и линии 62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19с, 10.28 Лазарь х Алая Заря, 2-94-06, 1-98-02 по результатам ИФА показали положительный результат, симптомы системной мозаичности листьев и локального некроза. У сортов Вид-2, Тустеп, Тохтар, Удовицкий и линий 32-07-01 и 12-07-03 были обнаружены симптомы локальной некротической реакции листовой ткани, которые сопровождалась слабоположительным уровнем детектируемого сигнала в ИФА. Известно, что слабый уровень репликации PVY в растениях, содержащих ген экстремальной штаммонезависимой устойчивости, может происходить в первично инфицированных клетках, однако протекание в них ограниченной некротической реакции обычно полностью блокирует дальнейшее распространение вирусной инфекции [56, р 93.]. У сортов Мечта Красавина, Лина Костаная, Карасайский и Ягодный-19 также наблюдалась слабоположительная реакция в ИФА и мозаичность листьев. У селекционных линий 53 с-ц 52-99, 4-08-02, 27-10-03, 9-07-12, 32-07-01, 15-08-03, и сортов Нэрли, Мирас, Улан и Альянс наблюдалась локальная некротическая реакция листовой ткани, однако в ИФА результаты оказались отрицательными.

Полное отсутствие симптомов вирусной инфекции было зафиксировано у сортов Аксор, Жанайсан, Памяти Конаева, Костанайские новости, Артем, Вид-1, Валерий и линии 15 с-ц 7П41 х Добро. Исследование биоматериалов этих образцов в ИФА также не выявило наличие вируса. Следует отметить, что ранее уже сообщалось об отсутствии естественной зараженности PVY сортов картофеля Валерий, Тустеп, Ягодный-19, Костанайские новости и Артем [262, 263].

В наших исследованиях у сорта Ильин был зафиксирован положительный результат в ИФА, однако симптомов выявлено не было, заражение инфекцией происходило по латентному типу. В ходе искусственного инфицирования растений картофеля, симптомы поражения PVY были обнаружены у пяти образцов, не имеющих молекулярных маркеров (сорта Акжар, Адиль и Алая заря, линии 2-94-06 и 1-98-02), а также у одного образца (сорт Дуняша), содержащего RAPD-маркер PVY38-530. Наличие вируса в растительных тканях этих образцов было подтверждено лабораторно-диагностическим исследованием. Симптомы мозаичности листовой ткани в условиях фитотрона были зафиксированы у растений сорта Курант-1, в генетическом материале которого был детектирован маркер RYSC3. В диагностическом исследовании биоматериала сорта Курант-1 был выявлен слабоположительный результат, свидетельствующий об очень низком уровне поражения PVY. Все вышеописанные результаты свидетельствуют о восприимчивости сортов Акжар, Алая заря, Дуняша, Курант-1, Адиль и линий 2-94-06, 1-98-02, 62.211.108.5 с-ц Тамаша х Ягодный-19с, 10.28 Лазарь х Алая Заря к поражающему действию PVY.

Полное отсутствие симптомов вирусной инфекции, в изолированных условиях фитотрона, было зафиксировано у сортов Валерий, Вид-1 и Костанайские новости, а также линии 15 с-ц 7П41 х Добро, обладающих молекулярным маркером RYSC3. Исследование биоматериалов этих образцов в ИФА не выявило наличие вируса, что свидетельствует о том, что сорта Валерий, Вид-1 и Костанайские новости, линия 15 с-ц 7П41 х Добро обладают экстремальным типом устойчивости к PVY, связанным с наличием в генотипе этих образцов доминантного аллеля гена *Ry-and*. Следует отметить, что в литературных источниках описан достаточно высокий уровень ассоциации ДНК-маркера RYSC3 с фенотипически наблюдаемым проявлением признака экстремальной устойчивости растений картофеля к PVY [264, 265].

В ходе искусственного инфицирования в изолированных и контролируемых условиях фитотрона у четырех образцов – Алая заря-2 (наличие маркера PVY38-530), Вид-2 (ДНК-маркеры не обнаружены), Тустеп (комбинация маркеров RYSC3 и PVY38-530) и Удовицкий (комбинация маркеров *Ry186* и PVY38-530) были обнаружены симптомы локальной некротической реакции листовой ткани, которые сопровождались слабоположительным уровнем детектируемого сигнала в ИФА. В настоящее время из полученных результатов невозможно сделать однозначный вывод о наличии *Ry*-генов у этого ряда образцов, особенно учитывая относительно

невысокий уровень ассоциации RAPD-маркера PVY38-530 [265, с. 23]. Известно, что слабый уровень репликации PVY в растениях, содержащих ген экстремальной штаммозависимой устойчивости, может происходить в первично инфицированных клетках, однако протекание в них ограниченной некротической реакции обычно полностью блокирует дальнейшее распространение вирусной инфекции [266]. В ряде случаев подобные локальные микронекрозы могут значительно увеличиваться до визуально-выявляемых размеров вследствие размножения вируса в обширной области эпителиальной ткани, не затрагивая при этом ткань мезенхимы [56, р. 57; 266, с. 65]. Для обозначения очень слабого уровня размножения вируса в иммунных растениях был предложен термин «сублиминальная инфекция» [267]. Явление сублиминальной инфекции может служить лишь одним из возможных объяснений визуально наблюдавшихся нами некрозов листовой ткани, сопровождавшихся согласно данным ИФА очень низким уровнем содержания PVY. Альтернативный вариант объяснения, наблюдаемой нами некротизации листовой ткани у этого ряда образцов, может быть связан с развитием СВЧ, обусловленной наличием в генотипе этих сортов различных *N*-генов устойчивости. Принимая во внимание данные литературы [52, р. 571], и, учитывая, что при проведении инокуляции нами использовались изоляты группы штаммов PVY^{NTN}, то можно заключить, что в наблюдавшемся процессе не могут принимать участие штаммозависимые гены развития СВЧ *Ny* и *Nc*, но не исключается возможное участие штаммозависимого гена *Nz*. Практическая проверка данного варианта пока сдерживается отсутствием в коллекции ученых из Казахстана и России изолятов вируса, достоверно относящихся к штамму PVY^Z. В ходе проведенного исследования в генотипе всех одиннадцати исследованных образцов картофеля не был обнаружен молекулярный маркер S1d11 (таблица 14), что с очень высокой вероятностью позволяет исключить из участия в наблюдавшемся процессе некрозообразования работу гена *Ny-1*, способного индуцировать развитие штаммозависимой СВЧ у растений картофеля в ответ на PVY-инфекцию. Для проверки влияния другого штаммозависимого гена *Ny-2*, также способного индуцировать развитие СВЧ, требуется проведение дополнительных исследований. Согласно литературным данным процесс образования некрозов при протекании СВЧ, в значительной степени зависит от температуры окружающей среды [267, с. 95]. Показано, что полноценное протекание СВЧ у растений картофеля, содержащих гены *Ny-1* и *Ny-2*, осуществляется лишь при умеренной температуре (20°C) и полностью блокируется при повышении температуры до 28°C [57, р. 267]. Влияние температуры окружающей среды на процесс образования микронекрозов в первично инфицированных клетках у растений, обладающих *R*-генами экстремальной устойчивости к PVY, в настоящее время практически не исследовано. Мы предполагаем, что проведение искусственного инфицирования в регулируемых условиях выращивания в значительной степени способствует более обширной фенотипической характеристике ответов растений картофеля на вирусную инфекцию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования сделаны следующие **выводы**:

1. Проведен скрининг семеноводческих и производственных посадок картофеля различных регионов Казахстана на основные распространенные вирусы картофеля коммерческими ИФА- и ПЦР-наборами. Наиболее распространенными вирусами в РК являются PVМ и PVS, менее: PVX, PLRV, PVY и PVA. Общая пораженность вирусами по регионам республики установлена в следующем убывающем порядке: Восточный, Южный, Центральный, Северный и Западный. Отобраны безвирусные и моноинфицированные PVY клоны: Artemis №79, Cherie №10, Aladin №1, №2, №6 и Агротип №30.

2. В результате идентификации штаммовой принадлежности Y-вируса картофеля у отобранных клонов картофеля установлено, что в Акмолинской, Кызылординской, Южно-Казахстанской, Алматинской, Восточно-Казахстанской, Костанайской, Западно-Казахстанской областях большинство образцов были поражены штаммом N-Wi (22 из 31), 3 – NTN, 1 – NTN+N-Wi, 1 – SIR-III, 1 – NE-11 и 1 образец – O. На основе метода генотипирования (ОТ-ПЦР) установлена принадлежность изолята PVY^{Ch} к ординарной (PVY^O) серотипической группе штаммов, изолята PVY^{Art-79} - к смешанной инфекции из изолятов, относящихся к группе обычных штаммов (PVY^O) и группе штаммов акропетального некроза (PVY^C). Четыре казахстанских изолята с разными рекомбинантными штаммами (N:O, N-Wi и NTNa) депонированы в GenBank с номерами доступа MK639789 - MK639792.

3. Получена коллекция местных изолятов Y-вируса картофеля, поддерживаемых *in vitro* в лаборатории биотехнологии растений кафедры «Защита и карантин растений» НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина».

4. Разработан отечественный иммуноферментный диагностикум для диагностики PVY на основе местного изолята Cherie №10, получены диагностические антисыворотки с чувствительностью ИФА-теста на обыкновенный штамм PVY 3 нг/мл, с титром до 1:1 638 400 в непрямом варианте ИФА. Разработанный ИФА-диагностикум позволяет обнаруживать основные группы штаммов PVY^N и PVY^O с чувствительностью определения в «сэндвич-варианте» - 1 и 2 нг/мл соответственно.

5. В результате изучения устойчивости к PVY установлено, что сорта картофеля Аксор, Жанайсан, Памяти Конаева, Костанайские новости, Артем, Вид-1, Валерий и 15 с-ц 7П41 x Добро обладают крайней (экстремальной) устойчивостью к PVY. Сорта Вид-2, Тустеп, Тохтар, Удовицкий, Мечта Красавина, Ягодный-19 и линии 32-07-01 и 12-07-03 по результатам изучения являются слабовосприимчивыми к PVY. Установлено, что сорта Акжар, Алая заря, Дуняша, Курант-1 и линии 62.211.108.5 с-ц Тамаша x Ягодный-19с, 10.28 Лазарь x Алая Заря, 2-94-06, 1-98-02 являются восприимчивыми к PVY.

Предложения для практической селекции:

1. Применять в качестве исходного материала для селекции сорта картофеля: Аксор, Жанайсан, Памяти Конаева, Костанайские новости, Артем, Валерий и селекционную линию 15 с-ц 7П41 х Добро, обладающие крайней (экстремальной) устойчивостью к PVY.

2. Использовать в селекционно-семеноводческой практике разработанную диагностическую тест-систему ИФА для выявления PVY.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Бойков С.В., Чирков С.Н., Сургучева Н.А. и др. Сравнение флокуляционных методов иммунодиагностики вирусов растений // Биохимия. – 1984. – №2. – С. 272-274.
- 2 Шпаар Д., Иванюк В., Шуманн П. и др. Картофель. – Минск: ФУА-информ, 1999. – 272 с.
- 3 Статистика сельского, лесного, охотничьего и рыбного хозяйства / Комитет по статистике // <http://stat.gov.kz/official/industry/14>. 11.03.2019.
- 4 Малько А.М., Анисимов Б.В., Трофимов Н.В. Контроль качества и сертификация семенного картофеля. – М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. – 316 с.
- 5 Швидченко В.К., Хасанов В.Т., Токбергенова Ж.А. и др. Производство семенного картофеля на безвирусной основе. – Астана, 2011. – 147 с.
- 6 Букасов С.М., Камераз А.Я. Селекция и семеноводство картофеля. – Л.: Колос. 1972. – 358 с.
- 7 Singh R.P. et al. The naming of Potato virus Y strains infecting potato // Arch. Virol. – 2008. – Vol. 153. – P. 1-13.
- 8 Сельское хозяйство – основа сильной экономики // <https://kapital.kz/economic/77001/sel-skoye-khozyaystvo-osnova-silnoy>. 04.09.2019.
- 9 Correll D.S. The potato and its wild relatives. Contributions from the Texas Research Foundation. – Renner, 1962. – 606 p.
- 10 Hawkes J.G. The potato: evolution, biodiversity and genetic resources. – London: Belhaven Press, 1990. – 259 p.
- 11 Ochoa, C.M. The potatoes of South America: Bolivia. – Cambridge: Cambridge Press, 1991. – 570 p.
- 12 Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Эртель Г. и др. Борьба с вирусными болезнями растений. – М.: Агропромиздат, 1986. – 479 с.
- 13 Блоцкая Ж.В. Вирусы картофеля. – Минск: Ураджай, 1989. – 72 с.
- 14 Вирусные болезни и семеноводство картофеля / под ред. Ю.И. Власова. – М.: Колос, 1976. – 824 с.
- 15 Бацанов Н.С. Картофель. – М.: Колос, 1970. – 376 с.
- 16 Gierer A., Schramm S. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus // Nature. – 1956. – Vol. 177. – P. 702-703.
- 17 Швидченко В.К., Созинова Л.Ф. Оздоровление, размножение и диагностика в картофелеводстве. – Астана: КАТУ им. С. Сейфуллина, 2000. – 160 с.
- 18 Трофимец Л.Н. Вирусные болезни картофеля. – М.: Знание, 1990. – 79 с.
- 19 Токбергенова Ж.А. Инновационные технологии в семеноводстве картофеля Казахстана. – Алматы: Таугуль-Принт, 2015. – 204 с.
- 20 Елисеева З., Тулегенов Т., Катин И. Идентификация Y-вируса картофеля // Вестник Агр. Scsi. – 1978. – №1. – С. 40-44.

- 21 Тулегенов Т., Елисеева З., Ахатова, Ф. Распространение и вред Y-вируса картофеля в Алма-Атинской области // Пер. Microb. Virol. Inst. Акад. Sci. Казахстан. – 1986. – №5 – С. 145–151.
- 22 Аскарлова М.А., Манадилова А., Садвакасова Г.Г. и др. Исследование картофельных полей Казахстана на вирусное заражение // Биотехнология. Теория и практика. – №2. – 1997. – С. 26-32.
- 23 Манадилова А., Садвакасова Г.Г., Бекельман Е. и др. Диагностика Y-вируса картофеля методом иммуноферментного анализа // Биотехнология. Теория и практика. – №3. – 1998. – С. 50-54.
- 24 Loebenstein G., Manadilova, A. Virus and Virus-like Diseases of Major Crops in Developing Countries. – Dordrecht: Springer, 2003. – 195 p.
- 25 Оспанова Г.С., Бозшатаева Г.Т., Турабаева Г.К. и др. Вирусные болезни пасленовых в Казахстане // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – №3-1. – С. 62-64.
- 26 Александрова А.М. и др. Распространение вируса картофеля (*Solanum tuberosum*) в Казахстане // Международный журнал биологии и химии. – 2018. – Т. 11, №1. – С. 33-40.
- 27 Александрова А.М., Карпова О.В., Наргилова Р.М. и др. Распространение вирусных болезней картофеля *Solanum Tuberosum* на территории Казахстана // Биология-XXI века: матер. 22-й междунар. студен. конф. – Пушино, 2018. – С. 274-279.
- 28 Scholthof K.B., Adkins S., Czosnek H. et al. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology // Mol Plant Pathol. – 2011. – Vol. 12. – P. 938-954.
- 29 Bhat A.I., Varma A., Pappu H.R. et al. Characterization of a potyvirus from eggplant (*Solanum melongena*) as a strain of Potato virus Y by N-terminal serology and sequence relationships // Plant Pathol. – 1999. – Vol. 48. – P. 648-654.
- 30 Aramburu J., Galipienso L., Matas M. Characterization of potato virus Y isolates from tomato crops in northeast Spain // Eur J Plant Pathol. – 2006. – Vol. 115. – P. 247-258.
- 31 Mascia T., Finetti-Sialer M.M., Cillo F. et al. Biological and molecular characterization of a recombinant isolate of Potato virus Y associated with a tomato necrotic disease occurring in Italy // J Pl Pathol. – 2010. – Vol. 92. – P. 131-138.
- 32 McIntosh C., O'Connell J. Extract from Potato Grower // <http://www.potatogrower.com/2014/02/study-shows-pvy-costs-idaho>. 24.02.2014.
- 33 Nolte P., Whitworth J., Thornton M.K. et al. Effect of seedborne Potato virus Y on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato // Plant Dis. – 2004. – Vol. 88. – P. 248-252.
- 34 De Bokx J.A., van der Want J.P.H. Viruses of potatoes and seed potato production. – Wageningen: Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc), 1987. – 259 p.
- 35 Whitworth J.L., Nolte P., McIntosh C. et al. Effect of Potato virus Y on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels // Plant Dis. – 2006. – Vol. 90(1). – P. 73-76.

- 36 Sigvald, R. The relative efficiency of some aphid species as vectors of Potato virus Y // *Potato Research*. – 1984. – Vol. 27(3). – P. 285-290.
- 37 Hari V. The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA // *Virology*. – 1981. – Vol. 112. – P. 391-399.
- 38 Hollings M., Brunt A.A. Potyvivuses // In book: *Handhook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis*. – Amsterdam: Elsevier/North Holland, 1981. – P. 731-807.
- 39 Shukla D.D., Frenkel M.J., Ward C.W. Structure and fuNction of potyvirus genome with special refereNce to the coat protein ending region // *Canadian J. Plant Pathology*. – 1991. – Vol. 13. – P. 178-191.
- 40 Leiser R.M., Richter J. Reinigung und einige Eigernschaften des Kartoffiel-YVirus // *Arch. Phytopathology*. – 1979. – Vol. 14. – P. 337-350.
- 41 Harrison H., Wiley D.C., Skehel J.J. Virus structure // In book: *Fields Virology*. N.Y.: Lippincott-Raven, 1996. – Vol. 10. – P. 59-100.
- 42 Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Дживахия В.Г. и др. *Общая и молекулярная фитопатология*. – М.: Общество фитопатологов, 2001. – 302 с.
- 43 Сухов К.С. Вирусные болезни раннего картофеля в Московской области и борьба с ними. – М.: Знание, 1964. – 77 с.
- 44 Гольдин М.И., Федотина В.Л. Диагностика вирусов картофеля по вирусным включениям // В кн.: *Вирусные болезни картофеля*. – М., 1966. – С. 8-13.
- 45 Федотина В.Л. Тяжеобразные включения как диагностический признак вирусного заболевания картофеля // *Вирусные болезни сельскохозяйственных культур и меры борьбы с ними: тр. 5 всесоюз. совещания по вирусным болезням растений*. – Киев, 1966. – С. 221-227.
- 46 Власов Ю.И., Ларина Э.И. *Сельскохозяйственная вирусология*. – М.: Колос, 1982. – 238 с.
- 47 Ross H. *Physalis floridana* as a local lesion test plant for potato virus Y // *Phytopathology*. – 1953. – Vol. 43, №1. – P. 1-8.
- 48 Gago S., Elena S.F., Flores R. et al. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid // *Science*. – 2009. – Vol. 323. – P. 1308.
- 49 Tromas N., Elena S.F. The rate and spectrum of spontaneous mutations in a plant RNA virus // *Genetics*. – 2010. – Vol. 185. – P. 983-989.
- 50 Smith K.M. Composite nature of some potato viruses of the mosaic group // *Nature*. – 1931. – Vol. 127. – P. 702.
- 51 Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M. et al. Discussion paper: The naming of Potato virus Y strains infecting potato // *Arch Virol*. – 2008. – Vol. 153. – P. 1-13.
- 52 Karasev A.V., Gray S.M. Continuous and emerging challenges of Potato virus Y in potato // *Annu Rev Phytopathol*. – 2013. – Vol. 51. – P. 571-586.
- 53 de Bokx J.A., de H. Huttinga. Potato virus Y. // *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*. – 1981. – Vol. 242. – P. 560-586.
- 54 Beemster A.B.R., de Bokx J.A. Survey of properties and symptoms // In book: *Viruses of potatoes and seed-potato production*. – Wageningen, 1987. – P. 84-113.

55 Cockerham G. Genetical studies on resistance to potato viruses X and Y // *Heredity*. – 1970. – Vol. 25. – P. 309-348.

56 Jones R.A.C. Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars // *Ann. Appl. Biol.* – 1990. – Vol. 117. – P. 93-105.

57 Szajko K., Strzelczyk-Zyta D., Marczewski W. Ny-1 and Ny-2 genes conferring hypersensitive response to Potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding // *Mol. Breed.* – 2014. – Vol. 34. – P. 267-271.

58 Karasev A.V., Hu X.J., Brown C.J. et al. Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY Strains // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 778-785.

59 Glais L., Faurez F., Tribodet M. et al. The amino acid 419 in HC-Pro is involved in the ability of PVY isolate N605 to induce necrotic symptoms on potato tubers // *Virus Res.* – 2015. – Vol. 208. – P. 110-119.

60 Gray S., De Boer S., Lorenzen J. et al. Potato virus Y: an evolving concern for potato crops in the United States and Canada // *Plant Dis.* – 2010. – Vol. 94. – P. 1384-1397.

61 Szajko K., Chrzanowska M., Witek K. et al. The novel gene Ny-1 on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to Potato virus Y and is an alternative to Ry genes in potato breeding for PVY resistance // *Theor. Appl. Genet.* – 2008. – Vol. 116. – P. 297-303.

62 Kerlan C., Tribodet M. Are all PVY isolates able to induce potato tuber necrosis ringspot disease? // *Proceed. 13th triennial conf. of the European association for Potato research*. – Veldhoven, 1996. – P. 65-66.

63 Kerlan C., Nikolaeva O.V., Hu X.J. et al. Identification of the molecular make-up of the Potato virus Y strain PVY^Z: genetic typing of PVY^{Z-NTN} // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 1052-1060.

64 Galvino-Costa S.B.F., Figueira A.D., Camargos V.V. et al. A novel type of Potato virus Y recombinant genome, determined for the genetic strain PVY^E // *Plant Pathology*. – 2012. – Vol. 61. – P. 388-398.

65 Chikh Ali M., Rowley J.S., Kuhl J. et al. Evidence of a monogenic nature of the Nz gene conferring resistance against Potato virus Y strain Z (PVY^Z) in potato // *Am J Potato Res.* – 2014. – Vol. 91. – P. 649-654.

66 Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. Biological characterization of various geographical isolates of Potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers // *Plant Pathology*. – 1994. – Vol. 43. – P. 138-144.

67 Browning I., Charlet K., Chrzanowska M. et al. What is PVY? Thereaction of potato cultivars to inoculation with a range of PVY isolates // *Proceed. 12th triennial conf. of the European association for potato research*. – Rennes, 2004. – P. 48-50.

68 Le Romancer M., Nedellec M. Effect of plant genotype, virus isolate and temperature on the expression of the potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) // *Plant Pathology*. – 1997. – Vol. 46. – P. 104-111.

- 69 Singh M., Singh R.P. A fast-reacting bioassay for the tobacco vein necrosis strain of Potato virus Y (PVY^N) // *Plant Dis.* – 1994. – Vol. 78. – P. 775-778.
- 70 Piche L.M., Singh R.P., Nie X., Gudmestad N.C. Diversity among Potato virus Y isolates obtained from potatoes grown in the United States // *Phytopathology.* – 2004. – Vol. 94. – P. 1368-1375.
- 71 Lorenzen J.H., Meacham T., Berger P.H. et al. Whole genome characterization of Potato virus Y isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada // *Arch Virol.* – 2006. – Vol. 151. – P. 1055-1074.
- 72 Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki K.T. Whole genome sequence and characterization of a novel isolate of PVY inducing tuber necrotic ringspot in potato and leaf mosaic in tobacco // *J Phytopathol.* – 2008. – Vol. 156. – P. 413-418.
- 73 Shukla D.D., Strike P.M., Tracy S.L. et al. The N and C termini of the coat proteins of Potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes // *J Gen Virol.* – 1988. – Vol. 69. – P. 1497-1508.
- 74 Shukla D.D., Ward C.W. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the Potyvirus group // *J Gen Virol.* – 1988. – Vol. 69. – P. 2703-2710.
- 75 Vuento M., Paananen K., Vihinenranta M. et al. Characterization of antigenic epitopes of Potato virus Y // *Biochim Biophys Acta.* – 1993. – Vol. 1162. – P. 155-160.
- 76 Hataya T., Inoue A.K., Ohshima K. et al. Characterization and strain identification of Potato virus Y isolate nonreactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains // *Intervirology.* – 1994. – Vol. 37. – P. 12-19.
- 77 Boudazin G., Le Romancer M., Weimann D.O. Localisation de deux épitopes sur la capsid du virus Y de la pomme de terre // *Annales du Tabac.* – 1995. – Vol. 2. – P. 51-57.
- 78 Ounouna H., Kerlan C., Lafaye P. et al. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of Potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation // *Plant Pathol.* – 2002. – Vol. 51. – P. 487-494.
- 79 Keller H., Pomp R., Bakker J. et al. Epitope identification and in silico prediction of the specificity of antibodies binding to the coat proteins of Potato virus Y strains // *Eur J Plant Pathol.* – 2005. – Vol. 111. – P. 391-397.
- 80 Ranki H., Hepojoki J., Lankinen H. et al. Epitopes of the Potato virus Y (PVY) coat protein recognized by monoclonal antibodies // *Proceed. 17th triennial conf. of European association for Potato research.* – Brasov, 2008. – P. 289-304.
- 81 Nikolaeva O.V., Roop D.J., Galvino-Costa S.B.F. et al. Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic isolates of Potato virus Y // *Am J Potato Res.* – 2012. – Vol. 89. – P. 121-128.
- 82 Tian Y.P., Hepojoki J., Ranki H. et al. Analysis of Potato virus Y coat protein epitopes recognized by three commercial monoclonal antibodies // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1-20.

83 Gugerli P., Fries P. Characterization of monoclonal antibodies to Potato virus Y and their use for virus detection // *J Gen Virol.* – 1983. – Vol. 64. – P. 2471-2477.

84 Ellis P., Stace-Smith R., Bowler G. et al. Production of monoclonal antibodies for detection and identification of strains of Potato virus Y // *Can J Plant Pathol.* – 1996. – Vol. 18. – P. 64-70.

85 Karasev A.V., Nikolaeva O.V., Hu X.J. et al. Serological properties of ordinary and necrotic isolates of Potato virus Y: a case study of PVY^N misidentification // *Am J Potato Res.* – 2010. – Vol. 87. – P. 1-9.

86 Dhar A.K., Singh R.P. Molecular characterization of coat protein genes of serologically distinct isolates of Potato virus Y necrotic strain // *Can J Microbiol.* – 1997. – Vol. 43. – P. 677-683.

87 Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki K.T. The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY^{NW} and PVY^{NTN} // *J Phytopathol.* – 2007. – Vol. 155. – P. 409-415.

88 Robaglia C., Durand-Tardif M., Tronchet M. et al. Nucleotide sequence of Potato virus Y (N strain) genomic RNA // *J Gen Virol.* – 1989. – Vol. 70. – P. 935-947.

89 Van der Vlugt R.A.A., Leunissen J., Goldbach R. Taxonomic relationships between distinct Potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3' non-translated regions // *Arch Virol.* – 1993. – Vol. 131. – P. 361-375.

90 Marie-Jeanne Tordo V., Chachulska A.M. et al. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of Potato virus Y genomic RNA // *J Gen Virol.* 1995. – Vol. 76. – P. 939-949.

91 Nie X., Singh R.P. Evolution of North American PVY^{NTN} strain Tu660 from local PVY^N by mutation rather than recombination // *Virus Genes.* – 2003. – Vol. 26. – P. 39-47.

92 Ogawa T., Nakagawa A., Hataya T. et al. The genetic structure of populations of Potato virus Y in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences // *J Phytopathol.* – 2012. – Vol. 160. – P. 661-673.

93 Martin D.P., Murrell B., Golden M. et al. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes // *Virus Evolution.* – 2015. – Vol. 1. – P. 1-5.

94 Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Genomic variability in potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^O and PVY^N isolates // *Arch Virol.* – 2002. – Vol. 147. – P. 363-378.

95 Glais L., Colombel A.S., Tribodet M. et al. PVY^N-605, the reference PVY^N isolate, displays a PVY^{NTN} non-recombinant genome // *Proceed. the 12th triennial conf. of the European Association for Potato Research. Virology Section Meeting.* – Le Tronchet, 2004. – P. 54.

96 Schubert J., Fomitcheva V., Sztangret-Wisniewska J. Differentiation of Potato virus Y strains using improved sets of diagnostic PCR-primers // *J Virol Methods*. – 2007. – Vol. 140. – P. 66-74.

97 Nie X.Z., Singh R.P. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR // *J Virol Methods*. – 2002. – Vol. 104. – P. 41-54.

98 Ogawa T., Tomitaka Y., Nakagawa A. et al. Genetic structure of a population of Potato virus Y inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations // *Virus Res*. – 2008. – Vol. 131. – P. 199-212.

99 Beczner L., Horvath J., Romhanyi I. et al. Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato // *Potato Res*. – 1984. – Vol. 27. – P. 339-352.

100 Revers F., Le Gall O., Candresse T. et al. Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates // *J Gen Virol*. – 1996. – Vol. 77. – P. 1953-1965.

101 Glais L., Tribodet M., Gauthier J.P. et al. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of Potato virus Y // *Arch Virol*. – 1998. – Vol. 143. – P. 2077-2091.

102 Boonham N., Walsh K., Hims M. et al. Biological and sequence comparisons of Potato virus Y isolates associated with potato tuber necrotic ringspot disease // *Plant Pathol*. – 2002. – Vol. 51. – P. 117-126.

103 Glais L., Kerlan C., Tribodet M. et al. Molecular characterization of potato virus Y^N isolates by PCR-RFLP // *Eur J Plant Pathol*. – 1996. – Vol. 102. – P. 655-662.

104 Weidemann H.L., Maiss E. Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of Potato virus Y (PVY) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction // *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz-J Plant Dis Protect*. – 1996. – Vol. 103. – P. 337-345.

105 Weilguny H., Singh R.P. Separation of Slovenian isolates of PVY^{NTN} from the North American isolates of PVY^N by a 3-primer PCR // *J Virol Methods*. – 1998. – Vol. 71. – P. 57-68.

106 Hu X.X., He C.Z., Xiao Y. et al. Molecular characterization and detection of recombinant isolates of Potato virus Y from China // *Arch Virol*. – 2009. – Vol. 154. – P. 1303-1312.

107 Chikh Ali M., Maoka T., Natsuaki T. et al. PVY^{NTN-NW}, a novel recombinant strain of Potato virus Y predominating in potato fields in Syria // *Plant Pathol*. – 2010. – Vol. 59. – P. 31-41.

108 Lorenzen J., Nolte P., Martin D. et al. NE-11 represents a new strain variant class of Potato virus Y // *Arch Virol*. – 2008. – Vol. 153. – P. 517-525.

109 Barker H., McGeachy K.D., Toplak N. et al. Comparison of genome sequence of PVY isolates with biological properties // *Am J Potato Res*. – 2009. – Vol. 86. – P. 227-238.

110 Chang F., Gao F.L., Shen J.G. et al. Complete genome analysis of a PVYN-Wi recombinant isolate from *Solanum tuberosum* in China // *Potato Res*. – 2015. – Vol. 58. – P. 377-389.

- 111 Karasev A.V., Hu X.J., Brown C.J. et al. Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY Strains // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 778-785.
- 112 Robles-Hernandez L., Gonzalez-Franco A.C. et al. First identification of an unusual recombinant Potato virus Y strain in potato in Mexico // *Plant Dis*. – 2010. – Vol. 94. – P. 1262-1262.
- 113 Kerlan C., Tribodet M., Glais L. et al. Variability of Potato virus Y in potato crops in France // *J Phytopathol*. – 1999. – Vol. 147. – P. 643-651.
- 114 Сиков В.А., Дьяков Ю.Т., Смирнов А.Н. и др. Иммунитет растений. – М.: Колосс, 2005. – 190 с.
- 115 Деверолл Б.Дж. Защитные механизмы растений. – М.: Колос, 1980. – 128 с.
- 116 Cooper J.I., Jones A. T. Responses of plants to viruses, proposals for the use of terms // *Phytopath*. – 1983. – Vol. 73. – P. 127-128.
- 117 Solomom-Blackburn R., Barker H. A review of host major-gene resistance to potato viruses X, Y, A and V in potato: genes, genetics and mapped locations // *Heredity*. – 2001. – Vol. 86. – P. 8-16.
- 118 Solomom-Blackburn R., Barker H. Breeding virus resistant potatoes (*Solanum tuberosum*): a review of traditional and molecular approaches// *Heredity*. – 2001. – Vol. 86. – P. 17-35.
- 119 Swiezynski K. M. Inheritance of resistance to viruses // *Potato genetics*. – 1994. – Vol. 103. – P. 229-363.
- 120 Valkonen J. P. T. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species// *Plant Breed*. – 1994. – Vol. 12. – P. 1-16.
- 121 Гавриленко Т.А., Рогозина Е.В., Антонова О.Ю. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии // Идентифицированный генофонд растений и селекция: сб. ст. – СПб., 2005. – С. 644-662.
- 122 Планк Я.Е. ван дер. Устойчивость растений к болезням / пер. с англ. – М.: Колос, 1972. – 254 с.
- 123 Le Romancer M., Kerlan C. Superficial ringspot necrosis of potato tubers, a recent disease caused by potato virus Y // *Agronomie*. – 1991. – Vol. 11. – P. 889-900.
- 124 Weidemann H-L. Nekrotische Ringsymptome an Kartoffelknollen. Ein neuer Stamm des Kartoffelvirus Y als Ursache // *Kartoffelbau*. – 1993. – Vol. 44. – P. 308-309.
- 125 Воловик А.С. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Агропромиздат, 1989. – 205 с.
- 126 Красавин В.Ф., Мошняков А.Н., Шарипова Д.С. и др. Изучение коллекции картофеля по основным хозяйственно-ценным признакам на юго-востоке Казахстана // *Картофелеводство: сб. науч. тр.: в 2 ч.* – Минск, 2013. – Т. 21, ч. 1 – С. 104-113.
- 127 Flor H.H. Genetics of pathogenicity in *Melampsora lini* // *J. Agric. Res*. – 1946. – Vol. 73. – P. 335-357.

128 Chrzanowska M., Muchalski T. Potato cultivars possessing Ry_{sto} gene react to PVY with internal necroses after graft inoculation // Abstracts of the 14th triennial Meeting for the EAPR. – Sorrento, 1999. – P. 543-544.

129 Vidal S., Cabrera H., Andersson R.A. et al. Potato gene Y-1 is an N gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y // Mol Plant-Microbe Interact. – 2002. – Vol. 15. – P. 717-727.

130 Vallejo R.L., Collins W.W., Young J.B. Inheritance of resistance to potato virus Y and potato virus X in hybrid *Solanum phureja* x *S. stenotomum* diploid potatoes // J. Heredity. – 1995. – Vol. 86. – P. 89-93.

131 Ross H. Inheritance of extreme resistance to virus Yin *Solanum stoloniferum* and its hybrids with *Solanum tuberosum* // Proceed. 3rd conf. Virus Diseases. – Wageningen, 1957. – P. 204-211.

132 Ross H. Dber die Yererbung von Eigenschaften fiir Resistenz gegen das Y- und Avirus in *Solanum stoloniferum* und die mtigliche Bedeutung fur eine allgemeine Genetik der Yirusresistenz in *Solanum Sect. Tuberarium* // Proceed. 4th conf. Potato Virus Diseases. – Braunschweig, 1960. – P. 40-49.

133 Mufioz F.J., Plaisted R.L., Thurston H.D. Resistance to potato virus Yin *Solanum tuberosum* ssp *andigena* // Am. Potato J. – 1975. – Vol. 52. – P. 107-115.

134 Galvez R., Brown C.R. Inheritance of extreme resistance to PVY derived from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* // Am. Potato J. – 1980. – Vol. 57. – P. 476-477.

135 Valkonen J.P.T., Slack S.A., Plaisted R.L. et al. Extreme resistance is epistatic to hypersensitive resistance to Potato Virus Y in a *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*-derived potato genotype // Plant Dis. – 1994a. – Vol. 78. – P. 1177-1180.

136 Hamalainen J.H., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T. et al. Mapping and marker-assisted selection of a gene for extreme resistance to potato virus Y // Theor. Appl. Genet. – 1997. – Vol. 94. – P. 192-197.

137 Brigneti G., Garcia-Mas J., Baulcombe D.C. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene Ry-sto in potato // Theor. Appl. Genet. – 1997. – Vol. 94. – P. 198-203.

138 Barker H. Inheritance of resistance to potato viruses Y and A in progeny obtained from potato cultivars containing Ry: evidence for the a new gene for extreme resistance to PVA // Theor. Appl. Genet. – 1996. – Vol. 93. – P. 710-716.

139 Hamalainen J.H., Sorri V.A., Watanabe K.N. et al. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyvirus in potato // The or. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 1036-1043.

140 Whitham S., Dinesh-Kumar S.P., Choi D. et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor // Cell. – 1994. – Vol. 78. – P. 101-1115.

141 Sorri V.A., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T. Predicted kinase-3a motif of a resistance gene analogue as a unique marker for virus resistance // Theor. Appl. Genet. – 1999. – Vol. 99. – P. 164-170.

- 142 Celebi-Toprak F., Slack S.A., Jahn M.M. A new gene, *Nytr*, for hypersensitivity to Potato Virus Y from *Solanum tuberosum* Maps to Chromosome IV // *Theor. Appl. Gen.* – 2002. – Vol. 104. – P. 669-674.
- 143 Culver J.N. Viral avirulence genes // *Plant-Microbe Interact.* – 1997. – Vol. 1. – P. 196-219.
- 144 Valkonen J. Virus-host interactions and breeding for resistance in potato // *Breeding Sci.* – 2015. – Vol. 65(1). – P. 69-76.
- 145 Bendahmane A., Kanyuka K., Baulcombe D.C. The *rx*-gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses // *Pl. Cell.* – 1999. – Vol. 11. – P. 781-791.
- 146 Gebhardt C., Valkonen J.P.T. Organization of genes controlling diseases resistance in the potato genome // *Ann. Rev. Phytopath.* – 2001. – Vol. 39. – P. 79-102.
- 147 Gebhardt C., Bellin D., Henselewski H. et al. Valkonen Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato // *Theor Appl Genet.* – 2006. – Vol. 112. – P. 1458-1464.
- 148 Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A. et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ryadg* based on a common feature of plant disease resistance genes // *Genome.* – 2000. – Vol. 43. – P. 1-8.
- 149 Rizza M.D., Vilario F.L., Torres D.G., Maeso D. Detection of PVY extreme resistance gene in potato germplasms from Uruguayan breeding program // *Am J Pot Res.* – 2006. – Vol. 83. – P. 297-304.
- 150 Heldák J., Bežo M., Štefúnová V., Galliková A. Selection of DNA markers for detection of extreme resistance to potato virus Y in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) F1 Progenies // *Czech J Genet Plant Breed.* – 2007. – Vol. 43. – P. 125-134.
- 151 Bhardwaj V., Kaushik S.K., Chakrabarti S.K. et al. Combining resistance to late blight and PVY in potato // *Potato J.* – 2007. – Vol. 34. – P. 41-42.
- 152 Whitworth J.L., Novy R.G., Hall D.G. et al. Characterization of broad spectrum potato virus Y resistance in a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*-derived population and select breeding clones using molecular markers, grafting, and field inoculations // *Am J Pot Res.* – 2009. – Vol. 86. – P. 286-296.
- 153 Sagredo D.B., Mathias R.M., Barrientos P.C. et al. Evaluation of a SCAR RYSC3 marker of the *Ryadg* gene to select resistant genotypes to Potato virus Y (PVY) in the Inia potato breeding program // *Chilean J Agr Res.* – 2009. – Vol. 69. – P. 305-315.
- 154 Song Y.-S., Schwarzfischer A. Development of STS markers for selection of extreme resistance (*Rysto*) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars // *Am J Pot Res.* – 2008. – Vol. 85. – P. 159-170.
- 155 Valkonen J.T.P., Wiegmann K., Hämäläinen J.H. et al. Evidence for utility of the same PCR-base markers for selection of extreme resistance to Potato virus Y controlled by *Rysto* of *Solanum stoloniferum* derived from different sources // *Ann Appl Biol.* – 2008. – Vol. 152. – P. 121-130.

156 Flis B., Hennig J., Strzelczyk-Zyta D. et al. The Ry-fsto gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistant to Potato virus Y maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122718 in PVY resistant potato cultivars // *Mol Breed.* – 2005. – Vol. 15. – P. 95-101.

157 Witek K., Strzelczyk-Zyta D., Hennig J. et al. A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles Ry-fsto and Ns // *Mol Breeding.* – 2006. – Vol. 18. – P. 273-275.

158 Hosaka K., Hosaka Y., Mori M. et al. Detection of a simplex RAPD marker linked to resistance to potato virus Y in a tetraploid potato // *Am J Pot Res.* – 2001. – Vol. 78. – P. 191-196.

159 Sato M., Nishikawa K., Komura K. et al. Potato virus Y resistance gene, Rychc, mapped to the distal end of potato chromosome 9 // *Euphytica.* – 2006. – Vol. 149. – P. 367-372.

160 Стандарт ЕЭК ООН S-1, касающийся сбыта и контроля товарного качества семенного картофеля. – 14.11.2016. – Нью-Йорк; Женева: Организация Объединенных Наций, 2016. – 44 с.

161 Zimnoch-Guzowska E., Syller J., Siczka M. The Methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding. – Radzikow: IHAR, 2001. – 131 p.

162 MacLeod D.J. Mosaic and streak viruses of the potato. Edited by Canada Department of Agriculture // *Research Branch.* – 1962. – Vol. 3. – P. 44-55.

163 Chrzanowska M. New isolates of the necrotic strain of Potato virus Y (PVY^N) found recently in Poland // *Potato Res.* – 1991. – Vol. 34(2). – P. 179-182.

164 Smith K.M., Dennis R.W.G. Some notes on a suspected variant of *Solanum virus 2* (Potato virus Y) // *Ann. Appl. Biol.* – 1940. – Vol. 27. – P. 65-70.

165 Bawden F.C., Kassanis B. The behaviour of some naturally occurring strains of Potato virus Y // *Ann. Appl. Biol.* – 1947. – Vol. 34. – P. 503-516.

166 Kahn R.P., Monroe R.L. Detection of the tobacco veinal necrosis strain of Potato virus Y in *Solanum cardenasii* and *S. andigenum* introduced into the United States // *Phytopathology.* – 1963. – Vol. 53. – P. 1356-1359.

167 Кучумов А.П., Анисимов Б.В. Методы производства семенного картофеля на безвирусной основе. – М., 1974. – 82 с.

168 Bawden F.C., Kassanis B. Serologically related strains of Potato virus Y that are not mutually antagonistic in plants // *Ann. Appl. Biol.* – 1951. – Vol. 38. – P. 402-410.

169 Horvath J. Studies on strains of Potato virus Y. 2. Strain C. *Acta // Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* – 1965. – Vol. 1. – P. 125-138.

170 de Bokx J.A., Kratchanova B., Maat D.Z. Some properties of a deviating strain of Potato virus Y // *Potato Res.* – 1975. – Vol. 18. – P. 38-51.

171 Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля. – Л.: Колос, 1976. – 152 с.

172 Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of microplate method of Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay for the detection of plant viruses // *J. Gen. Virol.* – 1977. – Vol. 34. – P. 475-480.

- 173 Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М., 2000. – 76 с.
- 174 Гнutowa P.B. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
- 175 Rose D.G., Hubbard A.L. Production of monoclonal antibodies for the detection of Potato virus Y. // *Ann. Appl. Biol.* – 1986. – Vol. 109. – P. 317-321.
- 176 Kerlan C., Robert Y., Perennec P. et al. Survey of the level of infection by PVY^O and control methods developed in France for potato seed production // *Potato Res.* – 1987. – Vol. 30(4). – P. 651-667.
- 177 Ohshima K., Inoue A.K., Ishikawa Y. et al. Production and application of monoclonal antibodies specific to ordinary strain and necrotic strain of potato virus Y // *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* – 1990. – Vol. 56(4). – P. 508-514.
- 178 Sanz A., Cambra M., Desanroman C.P. et al. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of Potato virus Y isolates infecting potato // *Potato Res.* – 1990. – Vol. 33(3). – P. 365-375.
- 179 McDonald J.G., Kristjansson G.T. Properties of strains of Potato virus YN in North America // *Plant Dis.* – Vol. 77(1). – P. 87-89.
- 180 Гиббс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений. – М.: Мир, 1978. – 430 с.
- 181 Brakke M.K. Density-gradient centrifugation and its application to plant viruses // *Adv. Virus Res.* – 1960. – Vol. 7. – P. 193-224.
- 182 Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. – М.: Высшая школа, 1985. – 287 с.
- 183 Mierzwa Z., Aleksanrowicz J. Izolacja przeciwciał z surowic krolek szczepionych wirusami ziemniaka X, Y, M i S // *Ziemniak.* – 1973. – №2. – P. 55-67.
- 184 Matsumoto T. The mode of formation of IgM and IgG antibodies to cucumber dreem mottle mosaic virus (watermelon strain) in rabbits // *Ibid.* – 1981. – Vol. 47, №5. – P. 611-617.
- 185 Reichlin M. Quantitative immunological studies on single amino acid substitution in human hemoglobin: Demonstration of specific antibodies to multiple sites // *Immunochemistry.* – 1974. – Vol. 11, №11. – P. 21-27.
- 186 Van Regenmortel M.H.V., Von Wechmar M.B. A re-examination of the serological relationship between tobacco mosaic virus and cucumber virus // *Ibid.* – 1979. – Vol. 41, №4. – P. 330-339.
- 187 Метьюз Р. Серология растительных вирусов. – М.: Издательство иностранной литературы, 1961. – 183 с.
- 188 Шмыгля В.А. Методика контроля и требования к качеству диагностических сывороток к вирусам и бактериям, поражающим картофель. – М.: Агропромиздат, 1970. – 13 с.
- 189 Ногейл И. Некоторые результаты по диагностике вирусов картофеля // *Вирусные болезни растений Дальнего Востока: сб. ст.* – Владивосток: ДВНЦ АН ССР, 1974. – Т. 21. – С. 67-70.

- 190 Van Slogteren E., Van Slogteren D.H.M. Serological identification of plant viruses and serological diagnosis of virus diseases of plant // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1957. – Vol. 49, №3. – P. 248-252.
- 191 Anderer F.A., Schlumberger H.D., Strobel G. Tobacco mosaic virus specific immunoglobulins from horse serum. 1. Physical and chemical characterization // *Europ. J. Immunol.* – 1971. Vol. 1, №2. – P. 75-81.
- 192 Badarau C.L. et al. The influence of samples incubation on detection of PLRV and the effect of some extraction buffer's additives on the detection of Potato viruses S, Y, A, X and S by ELISA technique // *Analele Univ. din Oradea.* – 2009. – Vol. 16, №2. – P. 15-19.
- 193 Bergervoet J.H. et al. Multiplex microsphere immuno-detection of potato virus Y, X and PLRV // *J. Virol. Methods.* – 2008. – Vol. 149, №1. – P. 63-68.
- 194 Moalic V., Mercier B., Ferec C. Technologie Luminex: principe, applications et perspectives // *Immuno-analyse & Biologie spécialisée.* – 2004. – Vol. 19. – P. 181-187.
- 195 Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции вирусов растений // *Прикладная биохимия и микробиология* – 2009. – №2. – С. 225-231.
- 196 Olsen N., Woodell L., Miller J. et al. Using diagnostic test kits in the field and storage // *Proceedings of the University of Idaho Winter Commodity Schools.* – 2011. – Vol. 43. – P. 25-37.
- 197 Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase // *Science.* – 1988. – Vol. 239(4839). – P. 487-491.
- 198 Singh M., Singh R.P. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization // *J. Virol. Methods.* – 1996b. – Vol. 60(1). – P. 47-57.
- 199 Singh R.P., Kurz J., Boiteau G. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction // *J. Virol. Methods.* – 1996. – Vol. 59(1-2). – P. 189-196.
- 200 Rosner A., Maslenin L. Differentiating PVY^{NTN} by unique single-restriction cleavage of PCR products // *Potato Res.* – 1999. – Vol. 42. – P. 215-221.
- 201 Rosner A., Maslenin L. Differentiating PVY^{NTN} from PVY^N by annealing to reference RNA transcripts // *J. Virol. Methods.* – 2001. – Vol. 97. – P. 125-131.
- 202 Moravec T., Cerovska N., Boonham N. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY^{NTN}) using a three- primer PCR based in the coat protein gene // *J. Virol. Methods.* – 2003. – Vol. 109. – P. 63-68.
- 203 Glais L., Tribodet M., Kerlan C. Specific detection of the PVY^{N-W} variant of Potato virus Y // *J. Virol. Methods.* – 2005. – Vol. 125. – P. 131-136.
- 204 Rigotti S., Gugerli P. Rapid identification of Potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR // *J. Virol. Methods.* – 2007. – Vol. 140. – P. 90-94.

205 Nie X., Singh R.P. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers // *J. Virol. Methods.* – 2001. – Vol. 91. – P. 37-49.

206 Chikh Ali M.C., Karasev A.V., Furutani N. et al. Occurrence of Potato virus Y strain PVY^{NTN} in foundation seed potatoes in Japan, and screening for symptoms in Japanese potato cultivars // *Plant Pathol.* – 2013. – Vol. 62(5). – P. 1157-1165.

207 Agindotan O., Shiel J.P., Berger P.H. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by TaqMan real-time RT-PCR // *Journal of Virological Methods.* – 2007. – Vol. 142. – P. 1-9.

208 Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Эффективный метод диагностики и идентификации вирусных патогенов картофеля // *Молекулярная биология* – 2009. – Т. 43. – С. 558-567.

209 Varveri C., Potato Y. Potyvirus Detection by Immunological and Molecular Techniques in Plants and Aphids // *Phytoparasitica.* – 2000. – Vol. 2, №28. – P. 243-251.

210 Yu F., Drygin S.N., Chirkov O.A. et al. High-sensitive technologies for molecular diagnostics of potato virus and viroid infections // *Potato Production and Innovative Technologies.* – 2007. – №15. – P. 274-285.

211 Boulard F., Glais L. Détection du virus Y (PVY) directement sur tubercules // *La Pomme de Terre Française.* – 2015. – Vol. 602. – P. 56-58.

212 Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): метод. пос. – М., 2012. – 76 с.

213 Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: метод. указ. – СПб.: ВИР РАСХН, 2011. – 54 с.

214 James H., Lorenzen A. Multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures // *Plant Disease.* – 2006. – Vol. 90, №7. – P. 935-940.

215 Chikh-Ali M., Naidu R.A., Karasev A.V. First Report of Potato virus Y (PVY) Strain PVY^C Associated with a Tomato Disease in Kenya // *Plant Disease.* – 2016. – Vol. 100. – P. 864.

216 Chikh-Ali M., Bosque-Pérez N.A., Pol D.V. Occurrence and Molecular Characterization of Recombinant Potato virus Y^{NTN} Isolates from Sulawesi, Indonesia // *Plant Disease.* – 2016. – Vol. 100. – P. 269-275.

217 Chikh-Ali M., Karasev A.V. Immunocapture-Multiplex RT-PCR for the Simultaneous Detection and Identification of Plant Viruses and Their Strains: Study Case, Potato Virus Y (PVY) // *Plant Pathology.* – 2010. – Vol. 1302. – P. 177-186.

218 Song Y-S., Hepting L., Schweizer G. et al. Mapping of extreme resistance to PVY (Ry^{sto}) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines // *Theor. Appl. Genet.* – 2005. – Vol. 111. – P. 879-887.

219 Tomczyńska I., Jupe F., Hein I. et al. Hypersensitive response to Potato virus Y in potato cultivar is conferred by the Ny-Smira gene located on long arm of chromosome IX // *Mol. Breed.* – 2014. – Vol. 34. – P. 471-480.

- 220 Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Колос, 2006. – 317 с.
- 221 Лялько Р.В. Использование культуры растительных тканей для получения диагностических антисывороток к некоторым мозаичным вирусам картофеля: автореф. ... канд. биол. наук: 06.01.11. – М., 1987. – 17 с.
- 222 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
- 223 Фримель Х. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
- 224 Атабеков И.Г., Бобкова А.Ф., Нацвлишвилли Н.М. и др. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля. – М., 1985. – 37 с.
- 225 Nakane P.K. New developments in tissue enzyme-labeled immunoassays // *Immunoassays: clinical laboratory techniques.* – 2015. – Vol. 4. – P. 157-169.
- 226 Козловская З.Н. Диагностика, штаммовое разнообразие, вредоносность и профилактика вируса огуречной мозаики на Дальнем Востоке: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11. – Владивосток, 2002. – 102 с.
- 227 Блоцкая Ж.В. Вирусные болезни картофеля. – Минск: Навука и тэхніка, 1993. – 222 с.
- 228 Hooker W.J. *Compendium of Potato Diseases.* – St. Paul: American Phytopathological Society, 1981. – 125 p.
- 229 Brown C.R. Breeding for resistance to potato leafroll and Y viruses: Report of the planning conference on Developments in the Control of Potato Virus Diseases. – Lima: International Potato Center, 1977. – 171 p.
- 230 Chrzanowska M. Evaluation of resistance and reaction of potato cultivars and breeders Selections to PVY strains // *W książce: The Methods of evaluation and selection applied in potato research and breeding.* – Radzikow: IJAR, 2001. – 131 p.
- 231 Вологин С.Г. Диагностика Y-вируса картофеля и штаммовый состав патогена в Среднем Поволжье: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07. – М., 2013. – 138 с.
- 232 Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). – М., 1985. – 351 с.
- 233 Иванников А.В., Томилов В.П. Практикум по биометрии: учеб. пос. – Астана, 2000. – 112 с.
- 234 Хасанов В.Т., Бейсембина Б., Сидорик А.И. Диагностика вирусных заболеваний, оздоровление и размножение семенного картофеля в Республике Казахстан: монография. – Астана: Издательство КАТУ им. С. Сейфуллина, 2017. – 151 с.
- 235 Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов: отчет о НИР (заключительный) / АО «КазАТУ им. С. Сейфуллина». – Астана, 2017. – 55 с. – Инв. №0217РК01685, №ГР 0115РК00478.

236 Khasanov V.T., Zhaowen H., Beisembina B. The results of the 1st year of testing potato varieties of Chinese selections in the conditions of Northern and Central Kazakhstan // *Phytosanitary security: integration into the scientific and educational space: mater. of the internat. scient. and pract. online conf.* – Astana: S. Seifullin KATU, 2018. – P. 94-100.

237 Alexandrova A.M., Karpova O.V., Nargilova R.M. et al. Distribution of potato (*Solanum tuberosum*) viruses in Kazakhstan // *International Journal of Biology and Chemistry.* – 2018. – Vol. 11, №1. – P. 33-40.

238 Александрова А.М., Карпова О.В., Наргилова Р.М. и др. Распространение вирусных болезней картофеля *Solanum tuberosum* на территории Казахстана // *Биология – XXI века: матер. 22-й междунар. студ. конф.* – Пушино, 2018. – С. 274-279.

239 Сечкина Т.Ю. Обоснование мероприятий, снижающих повторное заражение картофеля вирусами и ризоктониозом, применительно к технологии первичного семеноводства в горносопочной зоне Кокчетавской области: автореф. ... канд. с/х. наук: 06.01.11. – Самохваловичи, 1982. – 18 с.

240 Казенас Л.Д. Районы распространения самых опасных болезней в Казахстане // *Тр. КазНИИЗР.* – Алма-Ата, 1969. – С. 251-255.

241 Кузьмина Г.Н., Акзамбек А.М., Кабатаева Ж.К. Зараженность картофеля вирусными инфекциями в Восточном Казахстане // *Инновационные технологии на транспорте: образование, наука, практика: матер. 42-й междунар. науч.-практ. конф.* – Алматы, 2017. – Т. 1. – С. 520-523.

242 Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля. – М.: ФГНУ Росинформагротех, 2004. – 80 с.

243 Алексеев Я.И. ПЦР диагностика в современной агробиотехнологии // В кн.: *Проблемы агробиотехнологии.* – М.: Росинформагротех, 2012. – С. 200-226.

244 Хасанов В.Т., Швидченко В.К., Бейсембина Б. и др. Сравнение методов иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени для диагностики зараженности сортообразцов картофеля вирусами // *Вестник российской академии сельскохозяйственных наук.* – 2014. – №2. – С. 47-49.

245 Хасанов В.Т., Вологин С.Г., Бейсембина Б. Оценка распространения Y-вируса картофеля и дифференциация его серотипических групп в Республике Казахстан // *Вклад молодых ученых в развитие АПК в условиях четвертой промышленной революции: сб. матер. междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых* – Алматы: КазНАУ, 2018. – С. 75-80.

246 Baldauf P.M., Gray S.M., Perry K.L. Biological and serological properties of Potato virus Y isolates in northeastern United States potato // *Plant Dis.* – 2006. – Vol. 90. – P. 559-566.

247 Funke N., Nikolaeva O.V., Green K.J. et al. Strain-Specific Resistance to Potato virus Y (PVY) in Potato and Its Effect on the Relative Abundance of PVY Strains in Commercial Potato Fields // *Plant Disease.* – 2017. – Vol. 101. – P. 20-28.

248 Bai Y., Han S., Gao Y. et al. Genetic Diversity of Potato virus Y in Potato Production Areas in Northeast China // *Plant Disease*. – 2019. – Vol. 103. – P. 289-297.

249 Khassanov V.T., Beisembina B. et al. Occurrence of Three Recombinant Strains of Potato Virus Y in Potato in Kazakhstan // *Plant Disease*. – 2020. – Vol. 104, №1. – P. 297.

250 Ohshima K., Hataya T., Sano T. et al. Comparison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequences of coat protein between potato virus Y ordinary stain and necrotic strain (in Japanese) // *Nippon Shokubutsu Byori Gakkaiho*. – 1991. – Vol. 57. – P. 615-622.

251 Бейсембина Б. Изучение физических свойств казахстанских изолятов Y-вируса картофеля // Матер. республ. науч.-теорет. конф. «Сейфуллинские чтения-13: Сохраняя традиции, создавая будущее», посв. 60-летию казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – Астана, 2017. – Т. 1, ч. 1. – С. 293-296.

252 Поддержание коллекции фитопатогенных вирусов и их штаммов в культуре тканей растений: метод. реком. / сост. Н.И. Горбунова и др. – М. ВАСХНИЛ, 1986. – 20 с.

253 Khassanov V.T., Beisembina B., Fida A. Accumulation of potato virus Y in *Nicotiana tabacum* callus culture to obtain a virus preparation // *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* – 2016. – Vol. 39. – P. 145-153.

254 Хасанов В.Т., Варицев А.Ю., Бейсембина Б. Культура листовых каллусов – альтернативный метод создания и поддержания коллекции штаммов фитопатогенных вирусов на примере Y-вируса картофеля // История развития и результаты научных исследований по культуре картофеля: сб. науч. тр. всеросс. НИИ картофелеводства им. А.Г. Лорха. – М., 2015. – С. 437-443.

255 Хасанов В.Т., Варицев Ю.А., Оразбаева Г.К. и др. Получение и характеристика очищенного препарата Y-вируса картофеля из каллусной ткани табака // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля». – М., 2014. – С. 147-153.

256 Бейсембина Б., Хасанов В.Т. Получение вирусного препарата и диагностических антисывороток для выявления Y-вируса картофеля // Приоритеты агропромышленного комплекса: научная дискуссия: матер. междунар. науч.-практ. конф., посв. 30-летию Независимости Республики Казахстан. – Петропавловск: СКУ им. М. Козыбаева, 2021. – С. 56-60.

257 Евраз. пат. 030843, *G01N 33/531* (2006.01) *C12N 7/00*(2006.01). Способ получения иммуноферментного диагностикума для выявления Y-вируса картофеля / Хасанов В.Т., Бейсембина Б., Сидорик А.И.; опубл. 31.10.18., Бюл. №10. – 7 с.

258 Bradshaw, J.E., Mackay, G.R. Breeding strategies for clonally propagated potatoes / In book: *Potato genetics*. – Wallingford (UK): CABI, 1994. – P. 109-132.

259 Tiwari J. K., Gopal J., Singh B.P. Marker-assisted selection for virus resistance in potato: options and challenges // *Potato J.* – 2012. – Vol. 39(2). – P. 101-117.

260 Ермишин А.П., Воронкова Е.В., Козлов В.А. Картофель // В кн.: Генетические основы селекции растений: в 4 т. – Минск: Беларус. навука, 2010. – Т. 2. – С. 156-234.

261 Воронкова, Е.В., Лукша, В.И., Гукасян и др. Получение и отбор дигаплоидов *S. tuberosum*, перспективных для маркер-сопутствующей селекции на комплексную устойчивость к болезням и вредителям // Картофелеводство: сб. науч. тр. – Минск, 2011. – Т. 19. – С. 215-226.

262 Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов: отчет о НИР (промежуточный) / АО «КазАТУ им. С. Сейфуллина». – Астана, 2015. – 83 с. – №ГР 0115РК00478. – Инв. №0215РК02152.

263 Сидорик А.И., Хасанов В.Т. Оценка пораженности вирусными заболеваниями и полевой устойчивости к фитофторозу сортообразцов картофеля коллекционного питомника Костанайского НИИСХ // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина (междисциплинарный). – 2017. – №4(95). – С. 42-51.

264 Кузьминова О.А. Вологин С.Г., Гимаева Е.А. и др. Вклад признака устойчивости к Y-вирусу картофеля в формирование продуктивности у гибридной популяции картофеля // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30, №10. – С. 18-21.

265 Бирюкова В.А. Шмыгля И.В., Мелёшин А.А. и др. Изучение генетических коллекций ВНИИ картофельного хозяйства с помощью молекулярных маркеров // Достижения науки и техники АПК. – 2016. – Т. 30, №10. – С. 22-26.

266 Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э. и др. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – №21(1) – С. 62-73.

267 Малиновский В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам. – Владивосток: Дальнаука, 2010. – 324 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Евразийский патент



**ЕВРАЗИЙСКАЯ ПАТЕНТНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО**

ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ



ЕВРАЗИЙСКИЙ ПАТЕНТ

№ 030843

Название изобретения:

**«СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО
ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ У-ВИРУСА
КАРТОФЕЛЯ»**

Патентовладелец (льцы):

**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ САКЕНА СЕЙФУЛЛИНА" (KZ)**

Изобретатель (и):

**Хасанов Вадим Тагирович, Бейсембина Бибигуль (KZ), Варицев Юрий
Алексеевич, Варицева Галина Петровна, Галушка Павел Андреевич (RU),
Сидорик Александр Иванович (KZ), Усков Александр Иринархович (RU)**

Заявка №: 201600596
Дата подачи заявки: 01 июня 2016 г.
Дата выдачи патента: 31 октября 2018 г.

Настоящим удостоверяется, что евразийский патент выдан на изобретение с формулой, опубликованной в Бюллетене Евразийского патентного ведомства «Изобретения (евразийские заявки и патенты)» № 10 / 2018 год.

При уплате установленных годовых пошлин патент действует на территории государств - участников Евразийской патентной конвенции - Азербайджанской Республики, Кыргызской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Российской Федерации, Туркменистана.



ТЛЕВЛЕСОВА Сауле Январбековна
Президент Евразийского патентного ведомства

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Акты внедрения

«Утверждаю»

и.о. директора регионального филиала
ТОО «КазНИИПО» «Кайнар»

Мамырбеков Ж.Ш.

2021 г.



АКТ

внедрения научных результатов диссертационной работы в селекционный процесс создания новых сортов картофеля

Мы, нижеподписавшиеся, заместитель председателя правления по науке ТОО «Казахский НИИ плодовоощеводства» Токбергенова Ж.А., ГНС лаборатории селекции, семеноводства и биотехнологии картофеля, д.с.-х.н., профессор, академик АСХН РК Бабаев С.А., ВНС лаборатории селекции, семеноводства и биотехнологии картофеля, д.с.-х.н., профессор, академик АСХН РК Красавин В.Ф. составили настоящий акт о том, что выявленные в результате научных исследований в рамках диссертационной работы Бейсембиной Б. «Молекулярно-биологическое обоснование устойчивости сортов картофеля к штаммам PVY», устойчивые к PVY сорта картофеля казахстанской селекции: Аксор, Альянс, Жанайсан, Мирас, Нэрли, Памяти Конаева, Улан, Ушконыр, Шагалалы и гибриды: 4-08-02, 27-10-03, 9-07-12, 15-08-03 в настоящий момент применяются в селекционных программах в региональном филиале ТОО «Казахский НИИ плодовоощеводства» «Кайнар».

Заместитель председателя правления
по науке ТОО «КазНИИПО»

Токбергенова Ж.А.

ГНС лаборатории селекции, семеноводства
и биотехнологии картофеля

Бабаев С.А.

ВНС лаборатории селекции, семеноводства
и биотехнологии картофеля

Красавин В.Ф.

«Заречное» ауыл шаруашылығы тәжірибе
станциясы»
ЖАУАПҚЕРШІЛІГІ
ШЕКТЕУЛІ СЕРІКТЕСТІГІ

ТОВАРИЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
«Сельскохозяйственная опытная
станция «Заречное»

Қазақстан Республикасы, 111108, Қостанай облысы,
Қостанай ауданы, Заречное с., Юбилейный к., 12 үй
тел: 8 (71455) 6-10-05, 6-14-43
e-mail: zarechnoe-2014@mail.ru; sznpz@mail.ru

Республики Казахстан, 111108, Костанайская обл.,
Костанайский район, с. Заречное, ул. Юбилейная, д. 12,
тел: 8 (71455) 6-10-05, 6-14-43
e-mail: zarechnoe-2014@mail.ru; sznpz@mail.ru

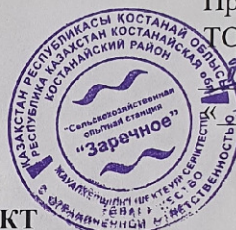
№ 182

« 1 » марта 2021 ж/г.

Утверждаю:

Председатель Правления
ТОО «СХОС «Заречное»
Джурабаев С.И.

» марта 2021 г.



АКТ

**внедрения научных результатов диссертационной работы
в селекционный процесс создания новых сортов картофеля**

Мы, нижеподписавшиеся, руководитель центра распространения знаний «Qostanai» Тайков В.В. и заведующий лабораторией селекции сельскохозяйственных культур Сидорик И.В., составили настоящий акт о том, что выявленные в результате научных исследований в рамках диссертационной работы Бейсембиной Б. на тему: «Молекулярно-биологическое обоснование устойчивости сортов картофеля к штаммам PVY», сорта картофеля казахстанской селекции, содержащие экстремальные гены устойчивости к PVY: Алая заря-2, Артем, Валерий, Вид-1, Костанайские новости и гибриды: 15 сеянец 7П41 х Добро, 23 сеянец 1069 х Адретта в настоящий момент применяются в селекционных программах в ТОО «СХОС «Заречное».

Руководитель центра распространения
знаний «Qostanai», магистр с/х наук

Тайков В.В.

Заведующий лабораторией селекции
сельскохозяйственных культур

Сидорик И.В.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В.1 – Пораженность картофелеводческих посадок регионов Республики Казахстан вирусной инфекцией

Название сорта	Количество зараженных образцов											
	PVX		PVY		PVS		PVM		PLRV		PVA	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ТОО «Костанайский НИИСХ» (с. Заречное, Костанайский район, Костанайская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												
Дуняша	27	90	21	70	18	60	24	80	30	100	9	30
Алая заря	21	70	6	20	18	60	6	20	27	90	3	10
Лина Костаная	27	90	24	80	30	100	24	80	30	100	12	40
Ягодный-19	12	40	0	0	24	80	27	90	24	80	3	10
Акжар	18	60	0	0	30	100	27	90	24	80	6	20
Костанайские новости	18	60	12	40	15	50	30	100	21	70	6	20
Тустеп	12	40	0	0	15	50	21	70	9	30	3	10
Валерий	9	30	0	0	3	10	27	90	27	90	0	0
Артем	21	70	0	0	18	60	9	30	21	70	6	20
Удовицкий	15	50	9	30	18	60	15	50	21	70	18	60
Коктем-1	15	50	15	50	15	50	30	100	7,5	25	23	75
Итого	195	59	87	26	204	62	240	73	242	73	89	27
Целиноградский овощной государственный сортоучасток (с. Косшы, Целиноградский район, Акмолинская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												
Мюзика	6	20	12	40	0	0	0	0	0	0	0	0
Королева Анна	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Акжол	18	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Лаперла	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Такома	18	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Винета	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Стем	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Пароли	6	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Джели	6	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Фортуна	30	100	18	60	18	60	24	80	18	60	12	40
НурАлем	24	80	18	60	24	80	30	100	30	100	18	60
Сеним	30	100	30	100	30	100	30	100	30	100	30	100
Асме	24	80	6	20	24	80	12	40	24	80	6	20
Тамыз	30	100	24	80	12	40	12	40	12	40	18	60
Памяти Лигая	24	80	30	100	30	100	30	100	0	0	30	100
Артем	18	60	24	80	12	40	30	100	30	100	30	100
Коктем-1	12	40	18	60	6	20	6	20	12	40	6	20
Зерен	30	100	18	60	12	40	18	60	30	100	30	100
Лина Костаная	0	0	30	100	6	20	6	20	18	60	0	0
Луса	0	0	0	0	6	20	12	40	6	20	12	40
Итого	276	46	228	38	180	30	210	35	210	35	192	32
ТОО «Енбек» (с. Аршалы, Аршалынский район, Акмолинская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Gala	13	44	15	51	17	56	8	28	20	67	19	64
Artemis	23	76	3	11	22	74	17	55	15	50	16	53
Rodrigo	1	3	1	3	4	13	1	3	2	8	11	37
Итого	37	41	20	22	43	48	26	29	38	42	46	51
ТОО «Астык-Stem» (с. Караагаш, Тайыншинский район, Северо-Казахстанская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												
Gala	3	10	1	3	1	2,5	5	18	2	8	0	0
Gala	5	15	2	5	2	5	4	14	1	3	0	0
Gala	7	24	26	88	30	100	30	100	4	12	18	59
Итого	15	16	29	19	32	36	40	44	7	8	18	20
ТОО «Макинка» (с. Макинка, Енбекшильдерский район, Акмолинская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												
Удача	2	7	28	93	30	100	30	100	6	21	11	36
Невский	0	0	28	93	30	100	30	100	0	0	19	64
Gala	0	0	28	93	28	93	30	100	2	8	7	23
Итого	2	2	84	93	88	98	90	100	9	10	37	41
ТОО «Иванов» (г. Петропавловск, Северо-Казахстанская область, Северный Казахстан, 2015 г.)												
Gala	9	30	11	35	8	25	0	0	9	30	8	25
ТОО «Карагандинский НИИ растениеводства и селекции» (с. Центральное, Бухаржырауский район, Карагандинская область, Центральный Казахстан, 2015 г.)												
Тамаша	11	34	11	34	32	100	30	94	15	47	13	41
ТОО «Найдоровское» (с. Осакаровка, Осакаровский район, Карагандинская область, Центральный Казахстан, 2015 г.)												
Невский	0	0	0	0	21	70	3	10	0	0	4	13
Artemis	6	21	5	16	13	42	0	0	0	0	8	27
Розара	11	36	17	55	19	63	0	0	2	5	14	47
Итого	17	19	21	24	53	58	3	3	2	2	26	29
ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства» (п. Кайнар, Карасайский район, Алматинская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Карасайский	0	0	0	0	30	100	30	100	8	25	5	17
Дуняша	0	0	0	0	30	100	30	100	0	0	0	0
Памяти Кунаева	0	0	0	0	30	100	30	100	0	0	2	8
Жанайсан	0	0	0	0	30	100	30	100	0	0	0	0
Бабаев	22	73	30	100	22	73	30	100	22	73	22	73
Итого	22	15	30	20	142	95	150	100	29	20	29	20
ТОО «Алтын» (Илийский район, Алматинская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Gala	30	100	30	100	30	100	30	100	26	88	26	88
ГУ «Республиканский центр карантина растений» (п. Шымбулак, Талгарский район, Алматинская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Улан	10	33	15	50	10	33	5	16	20	66	10	33
Ильин	10	33	10	33	5	16	30	100	10	33	15	50
Ушканыр	0	0	5	16	0	0	30	100	20	66	15	50
Тохтар	8	25	8	25	0	0	0	0	15	50	0	0
Тамаша	25	83	25	83	0	0	5	16	30	100	30	100

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Агротип	10	33	0	0	0	0	0	0	10	33	20	66
GSK-17	0	0	10	33	0	0	0	0	20	66	20	66
GSK-10	10	33	10	33	10	33	0	0	10	33	10	33
Нидер	23	75	23	75	0	0	8	25	30	100	30	100
Кундыз	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Цветочный	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	33
Итого	95	29	104	32	25	7	77	23	164	50	159	48
ТОО «Казахский НИИ рисоводства» (г. Кызылорда, Кызылординская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Жанайсан	21	69	15	50	30	100	30	100	11	38	15	50
Ушконыр	4	12	4	12	16	53	23	77	0	0	0	0
Тамаша	9	30	0	0	9	30	27	90	0	0	3	10
Aladin	17	55	25	82	30	100	30	100	5	18	19	64
Итого	50	42	43	36	85	71	110	92	17	14	37	31
КХ «Акбай» (с. Акбай, Сайрамский район, Туркестанская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Невский	30	100	30	100	21	70	30	100	27	90	30	100
Latona	30	100	30	100	9	30	30	100	30	100	30	100
Итого	60	100	60	100	30	50	60	100	57	95	60	100
КХ «Нурасыл» (с. Уланбель, Мойынкумский район, Жамбылская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Gala	24	80	24	80	9	30	27	90	30	100	30	100
КХ «ЗЛИХА» (с. Туктибай, Жуалынский район, Жамбылская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Aladin	24	80	9	30	6	20	15	50	15	50	6	20
Artemis	27	90	12	40	15	50	15	50	15	50	15	50
Итого	51	85	21	35	21	35	30	50	30	50	21	35
Шакпак баба (с. Шакпак баба, Тюлькубасский район, Туркестанская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Пегас	30	100	21	70	9	30	30	100	27	90	24	80
ИП «Нуржан» (с. Кулан, Рыскуловский район, Жамбылская область, Южный Казахстан, 2016 г.)												
Ароза	15	50	0	0	18	60	9	30	18	60	12	40
ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства» (п. Кайнар, Карасайский район, Алматинская область, Южный Казахстан, 2017 г.)												
Аксор	0	0	0	0	2	6	5	17	1	2	0	0
Нэрли	1	4	3	9	3	9	2	6	5	15	0	0
Астана	1	4	2	6	2	6	1	2	1	4	0	0
Улан	0	0	0	0	0	0	4	13	0	0	0	0
Итого	2	2	5	4	7	6	12	10	7	6	0	0
ТОО «Уральская опытная станция» (п. Деркул, Западно-казахстанская область, Западный Казахстан, 2017 г.)												
Лазарь х Весна	6	20	0	0	0	0	12	40	4	13	0	0
Урал 1	8	27	0	0	16	54	14	46	0	0	0	0
Астерикс	3	10	0	0	6	20	21	70	0	0	0	0
Коктем-1	17	57	2	7	0	0	28	93	9	29	0	0
Итого	34	29	2	2	22	19	75	62	13	11	0	0

Продолжение таблицы В.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ТОО «Актюбинская с/х опытная станция» (г.Актобе, Западно-Казахстанская область, Западный Казахстан, 2017 г.)												
Коктем-1	0	0	2	6	0	0	28	94	0	0	0	0
Aladin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Актюбинский – 2	0	0	0	0	25	83	30	100	0	0	0	0
2-94-1	2	6	0	0	8	28	30	100	0	0	0	0
Никитка	7	22	27	89	0	0	2	6	0	0	0	0
Итого	9	5	29	16	33	19	90	50	0	0	0	0
ТОО «Восточно-Казахстанский НИИ сельского хозяйства» (п. Опытное поле, Глубоковский район, Восточно-Казахстанская область, Восточный Казахстан, 2017 г.)												
Карасайский	29	95	27	89	30	100	30	100	29	95	0	0
Тохтар	18	60	16	54	28	92	30	100	23	76	0	0
Аксор	11	38	15	49	25	83	29	97	19	62	0	0
Тамаша	4	13	6	19	16	54	30	100	6	19	0	0
Тамыр	0	0	2	5	13	43	27	91	0	0	0	0
Итого	62	41	65	43	112	74	146	98	76	50	0	0
ТОО «Восточно-Казахстанский НИИ сельского хозяйства» (п. Опытное поле, Глубоковский район, Восточно-Казахстанская область, Восточный Казахстан, 2017 г.)												
Aladin	29	95	6	20	27	90	15	50	15	50	26	85
Gala	29	95	11	35	26	85	11	35	26	85	27	90
Тамыр	30	100	26	85	29	95	30	100	29	95	29	95
Карасайский	26	85	5	15	18	60	14	45	9	30	17	55
Розара	30	100	30	100	26	85	29	95	29	95	29	95
Аксор	23	75	5	15	21	70	18	60	12	40	24	80
Тохтар	30	100	5	15	18	60	30	100	23	75	26	85
Итого	195	93	86	41	164	78	146	69	141	67	176	84

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Нуклеотидные последовательности секвенированных изолятов PVY

>PVY9

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCC
AAAAGCAAGGGAGCaACCGTACTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTG
ATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGA
GATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAA
CCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAA
GTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAG
GCAAATTATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT
ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAA
GTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCG
GACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTA
CTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTAATAAGATAGAGG
TGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCaTTAT
TAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATCATCGA
TTAGG

>PVY10

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCC
AAAAGCAAGGGAGCAACCGTACTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATG
CTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTT
GATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTG
AGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGA
ACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACA
AGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTA
gGCAAATTATGGCACATTTCTCAGATGTtGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT
ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAA

GTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCG
GACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTA
CTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGG
TGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTA
TTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY14

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC
AGAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATG
CTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTT
GATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTG
AGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGA
ACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACA
AGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTA
GGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATtGAAATG
CGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCT
GCGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATC
ACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCA
GCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAG
TACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCA
AGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCC
GGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGT
ACTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAG
GTGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATT
ATTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATC
GATTAGG

>PVY18

TACTTATGAAGTACACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAaCCaaA
TcTCAACAAGGAAAAGgAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAACCTC
ATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCAAG
AGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCTCC
ACAGCAAATTGACATcTCAAATACTCGAGCAACTCaTcACAGTTTGATAC
GTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCATACGACATAGGAGAACTGAAATG
CCAACCTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTC
GCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAAGTC
GAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCaACaCTTAGGCA
AATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA
ACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAgTTCGTAATCTGCGC
GATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTgACTTTTATGAGGTCACATCACGA
ACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCGCAGCAT

TGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACA
CAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTA
TGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGAC
GATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTA
CTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGG
CAGGGTGATTTTCGTCAATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTA
AGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATCATCGATT
AGG

>PVY21

TACTTATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATTGATGCAGGA
GGAAGCAATAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAA
ATCTCAACAAAGAAAAGGAGAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAAC
TCACACTGTGCCACGAATTAAGCCATCACGTCTAAAATGAGAATGCCCA
AGAGTAAGGGTGCAACTGTACTGAACTTAGAACATTTACTCGAGTATGCT
CCACAGCAAATTGATATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGA
TACATGGTATGAAGCAGTACAGCTTGCTTACGACATAGGAGAAACTGAA
ATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTATGGTGCATTGAGAATGGAAC
CTCGCCAAACATCAACGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGAAATGAACAAG
TTGAATACCCACTCAAGCCGATTGTTGAAAATGCAAAACCAACCCTTAGG
CAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTtGCAGAAGCGTATATTGAAATGCGC
AACAAAAAgGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTTCGAAATCTGCG
TGATGGAAGTTTGGCTCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAAGTTACATCACG
TACACCAGTAAGGGCTAGAGAGGCACACATTCAAATGAAAGCCGCAGCT
CTGAAATCAGCTCAATCCCGACTTTTCGGATTGGATGGTGGCATTAGTAC
ACAAGAGGAAAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTTTCTCCAAGT
ATGCATACTCTACTTGGAGTGAAGAACATGTGATATAGTGTCTTTCCGGA
CGATATATAAATATTTATGTTTGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACT
ACTTTTATCGTAACTAATAATCATTTTGAATATTACTGGCAGATAGGGGTG
GTATAGCGATTCCGTCGTAGTACCTTAGCTGTCGTTTCTGTATTATT
ATGTTTGTGTA AAAAGTGCCGGGTTGTTGTTGTTGTGGCTGATCCATCGATT
AGG

>PVY23

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGTAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATTCAAGTCAA
ACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGAC
ACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCA
CAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCT
CCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGA
TACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAG
ATGCCAACTGTGATGAATGGgcTTATGGtTTGGTGCATTGAAAATGGAACC
TCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAAATGAACAAGT
CgagTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGGCA
AATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA
ACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGG

GATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGGTCACATCACGA
ACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCAT
TGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACA
CAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTA
TGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGAC
GATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTA
CTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGG
CAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTA
AGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATT
AGG

>PVY30

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC
ACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTG
ATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGA
GATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAA
CCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAA
GTTGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTA_g
GCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATACATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAGT
ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAA
GTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCG
GACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTA
CTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGG
TGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTA
TTAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTTGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY49

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGATCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCAA
ACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGAC
ACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCA
AAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCT
CCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGA
TACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAG
ATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAAC
CTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAG
TCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCaaCCCTTaggCA

AATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCGCA
ACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGG
GATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGA
ACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCAT
TGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACA
CAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTA
TGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGAC
GATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTA
CTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGG
CAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTA
AGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATT
AGG

>PVY50

TACTTATGAAGTGCACCATCAAGGAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCACTAAGAAGGATGCAAAACAAGAGCAAGGTAGCATTCAACCAA
ATCTCAACAAGGAGAAGGAAAAGGACGTGAATGTTGGAACATCTGGAAC
TCATACTGTGCCACGAATTAAGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCCCA
AGAGTAAAGGTGCAACTGTACTAAATTTGGAACACTTACTCGAGTATGCT
CCACAGCAAATTGACATCTCAAATACTCGAGCAACTCAATCACAGTTTGA
TACGTGGTATGAAGCGGTACAACCTTGCATACGACATAGGAGAACTGAA
ATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAAC
CTCGCCAAACATCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGAGATGAACAA
GTCGAATACCCACTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACACTTAG
GCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAGTTCGTAATCTG
CGCGATGGAAGTTTGGCTCGCTATGCTTTTACTTTTaTGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCgCaCATTCAAATGAAGGCCGCAGC
ATTGAAATCAGCCCAATCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTA
CACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAG
TATGCATACTCTACTTGGAGTCAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGG
ACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTAC
TACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGT
GGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTAT
TAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY53

CTCTTATGAAGTATAACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATTACGTCCAAAATGAGAATGCC
AAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATG
CTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTT
GATACGTGGTTTGGAGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTG
AGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGA

ACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACA
AGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTA
GGCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATTGAAATG
CGCAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCT
GCGGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATC
ACGAACACCAGTGAGGGCTAGGGaGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCA
GCATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAG
TACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCA
AGTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCC
GGACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGT
ACTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAG
GTGACAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATT
ATTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATC
GATTAGG

>PVY55

CTCTTATGAAGTAtACCATCAAGCAAATGACacaATCGATGCAGGAGG
AAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATcCAGTCAAAC
CCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGACAC
ATACTGtGCCGAGAATCAAGGCTATTACGTCCaAAATGAGAATGcCCAAAA
GCAAGGGAGCAACCGTGCTAAAcTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCTCCA
CAACAAAtTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTtTGATACG
TGTTTTGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAAACTGAGATGC
CAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGAACCTCG
CCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACAAGTCG
AGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAaCCCTTAggCAAA
TCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATAtGAAATGCGCAACA
AAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCGGGAT
GTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACGAACA
CCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGCATTGA
AATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAGTACACAA
GAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTATGC
ATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACGAT
ATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTACTT
TTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGACA
GGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTAAG
TCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTAG
G

>PVY57

CTCTTATGAAGTATAACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATTACGTCCAAAATGAGAATGCC
AAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATG
CTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTT

GATACGTGGTTTGGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTG
AGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGA
ACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACA
AGTCGAgTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCaaCCCTTA
gCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATtGAAATGCG
CAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAaTTCGAAATCTGC
GGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAC
GAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGC
ATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAGTA
CACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAG
TATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGG
ACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTAC
TACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGT
GACAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAAGTCCGCATTAT
TAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY60

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATTACGTCCAAAATGAGAATGCC
AAAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATG
CTCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTT
GATACGTGGTTTGGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTG
AGATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAGAATGGA
ACCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGGATGAACA
AGTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAaCCCTTA
ggCAAATCATGGCACATTTtCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATtGAAATGCG
CAACAAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTTCGAAATCTGC
GGGATGTGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAC
GAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGC
ATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATTAGTA
CACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAG
TATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGG
ACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTAC
TACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGT
GACAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAAGTCCGCATTAT
TAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY62

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC

ACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTG
ATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGA
GATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAA
CCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAA
GTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTAG
GCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT
ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAA
GTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCG
GACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTA
CTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGG
TGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTTTAATTCCGCATTAT
TAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATCATCGA
TTAGG

>PVY51

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCTAAAATGAGAATGCC
ACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTG
ATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGA
GATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAA
CCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAA
GTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTAG
GCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTTCGGGTTGGACGGTGGCATCAGT
ACACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAA
GTATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCG
GACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTA
CTACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGG
TGGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTACTCTATCTTTTAATTCCGCATTA
TTAAGTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY52

CTCTTATGAAGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA

AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC
ACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTG
ATACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGA
GATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAA
CCTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAA
GTCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTAG
GCAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGC
GCAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTG
CGGGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCA
CGAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAG
CATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTtCGGGTtGGACGGTGGCATCAGTA
CACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAG
TATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGG
ACGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTAC
TACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTAATAATAGATAGAGGT
GGCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTAT
TAAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCG
ATTAGG

>PVY56

CTCTTATGAAGTATAACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGCAGCAAGAAAGATGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCA
AACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGA
CACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCAAAATGAGAATGCC
ACAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGC
TCCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTtGA
TACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAG
ATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAAC
CTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTTATGATGGATGGGAATGAACAAAG
TCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAACCAACCCTTAGG
CAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATAGAAATGCG
CAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGC
GGGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCAC
GAACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCAAATGAAGGCCGCAGC
ATTGAAATCAGCCCAACCTCGACTTTtCGGGTTGGACGGTGGCATCAGTAC
ACAAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGT
ATGCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGA
CGATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCTGTACT
ACTTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTAATAATAGATAGAGGTG
GCAGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGACTCTATCTTTTAATTCCGCATTAT
AAGTCTTAGATAAAAAGTGCCGGGTTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGA
TTAGG

>PVY63

CTCTTATGAaGTATACCATCAAGCAAATGACACAATCGATGCAGGA
GGAAGcAGCAAGAAAGAtGCAAGACCAGAGCAAGGCAGCATCCAGTCAA
ACCCGAACAAAGGAAAAGATAAGGATGTGAATGCTGGTACATCTGGGAC
ACATACTGTGCCGAGAATCAAGGCTATCACGTCCaAAATGAGAATGCCCA
CAAGCAAGGGAGCAACCGTGCTAAACTTAGAACACTTGCTTGAGTATGCT
CCACAACAAATTGATATTTCAAATACTCGGGCAACTCAATCACAGTTTGA
TACGTGGTATGAGGCAGTGCGGATGGCATAACGACATAGGAGAACTGAG
ATGCCAACTGTGATGAATGGGCTTATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAAC
CTCGCCAAATGTCAACGGAGTTTGGGTATGATGGATGGGAATGAACAAG
TCGAGTACCCGTTGAAACCAATCGTTGAGAATGCAAAACCAACCCTTAGG
CAAATCATGGCACATTTCTCAGATGTTGCAGAAGCGTATATaGAAATGCG
CAACAAAAGGAACCATATATGCCACGATATGGTTTAATTCGAAATCTGCG
GGATATGGGTTTAGCGCGTTATGCCTTTGACTTTTATGAGGTCACATCACG
AACACCAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACATTCaAATGAAgGCCGCAGCAT
TGAaATCAGCcCAACCTCGACTTTTTGGGTTGGACGGTGGCATCAGTACAC
AAGAGGAGAACACAGAGAGGCACACCACCGAGGATGTCTCTCCAAGTAT
GCATACTCTACTTGGAGTTAAGAACATGTGATGTAGTGTCTCTCCGGACG
ATATATAAGTATTTACATATGCAGTAAGTATTTTGGCTTTTCCTGTACTAC
TTTTATCATAATTAATAATCAGTTTGAATATTACTAATAGATAGAGGTGGC
AGGGTGATTTTCGTCATTGTGGTGA CTCTATCTTTTAATTCCGCATTATTAA
GTCTTAGATAAAAGTGCCGGGTGTCGTTGTTGTGGATGATTCATCGATTA
GG

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица Д.1 – Родословная объектов исследований

Сорт картофеля	Родительские формы	Группа спелости	Оригинатор	Допущен к возделыванию	Год до пуска	Назначение
1	2	3	4	5	6	7
Жанайсан	Jubel x Anoka	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	6,9	2003	ст
Бабаев	Гибрид 720189	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2016	ст
Улан	Весна левобережная x Резерв (Atzimba x Камераз (Фитофтороустойчивый (Гибридный 14 x Карпаттский) x Sickingen))	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2003	ст
Аксор	(Смачный x Олев (Вирулане x Мюнхеберский гибрид 40663/21) x Резерв	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	2, 3, 5, 7, 9, 12	1998	ст
Памяти Конева	Межвидовая гибридизация (Гибрид 397073.16) LR93.120 x C 93.154	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2015	ст
Ушконец	Межвидовая гибридизация (Гибрид 392780-1) Sedafin x YU.3 КазНИИКС 80% и СР 20%	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2012	ст
Шагалалы	Vilnya x 128-6	2	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства», Кокшетауский филиал НПЦ зернового хозяйства им. А.Бараева	1	2008	ст
Альянс	Тетраплоидная межпопуляционная гибридизация LR93.221xC93.154 (гибрид 397077-16), КазНИИКО 80% и СР 20%	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	14	2011	ст

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7
Карасайский	Роет х Приекульский ранний	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	5	2009	ун
Ильин	Межвидовая гибридизация (гибрид 392781.1) LT-8 х 575049	2	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства», Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина	3, 5, 14	2003	ст
Нэрли	138 ж ч Фиделио	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2000	ст
Тохтар	клеточная селекция от Гатчинский (328-48 х Приекульский ранний)	3	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	1, 2, 7, 8	2005	ст
Мирас	межвидовой гибридизации (гибрид 388676-1). Тетраплоидная межпопуляционная гибридизация 378015.18 х PVY-ВК (гибрид 388676-1), КазНИИКО 80% и СР 20%	3	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2011	ст
Тустеп	с.15.7п-41 ч Добро129/4	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства»	3	2000	ст
Алая заря	Adretta (Apta х Stamm (<i>S.ang.</i> , <i>S. dem</i>) х Schwalbe, Axilia х Stamm) х Зарево (Бекра (<i>S. dem.</i>) х 7692/68 (<i>S. ang.</i> , <i>S. leptostigma</i> , <i>S. dem</i>))	4	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства, Сибирский НИИСХ	10	2004	ст
Алая заря -2	Костанайский НИИСХ отбор сеянцев от самоопыления сорта Алая заря (селекционный номер 54)	3	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	10	2020	ст
Вид-2	клон сеянца п 1898	4	ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства», Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	3	2013	ун

Продолжение таблицы Д.1

1	2	3	4	5	6	7
Вид-1	клон сеянца n 1898	3	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Снят с допуска	-	ст
Артем	отбор от Ермак улучшенный	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства, Сибирский НИИСХ	1, 5, 10	2009	ст
Дуняша	Шортандинский х Omega (Н 277/58 с участием <i>S.dms.</i> , <i>S.chilotanum.</i> , <i>S.adg.</i> х Tundra (уст-в к РВУ)	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	2, 4, 7, 10	1993	ст
Адиль	7П41 х Добро	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Снят с допуска	-	ст
Удовицкий	методом отбора из популяции сеянец Спиридона	6	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	8	2011	ст
Валерий	отбор от самоопыления Весна	3	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Проходит испытание	-	ст
Лина Костаная	Гибрид 1753 х 481-362-8	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Проходит испытание	-	-
Костанайские новости	сеянец сорта Тамаша (Ермак х Приекульский ранний)	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	8, 10	2008	ст
Курант-1	Идеал супер мутагенами нитрозометилмочевинный (НММ) в ИХФ АН	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Снят с допуска	1996	ст
Мечта Красавина	Лазарь (Ласунак х Зарево) х Бергиня	-	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Проходит испытание	-	-
Тэрра-1	С 1 Ягодный-19 19,100 n 1753 х 481-362-8	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	Снят с допуска	-	ст
Акжар	Vilija х (дигаплоид <i>S.ang.</i> USW 1793 X <i>S. rybinii</i>)	5	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	2, 4, 7, 10	1993	ст
Ягодный-19	n 1753 х 367-8	3	Северо-Западный НПЦ сельского хозяйства	1, 2, 7, 8	2005	ст
Примечания: группа спелости - 1 ультраранний; 2 раннеспелый; 3 среднеранний; 4 среднеспелый; 5 среднепоздний; 6 позднеспелый. Назначение: ун - универсальный; ст - столовый						

Таблица Д.2 – Области допуска к возделыванию

Наименование области	Порядковые номера административных областей
Акмолинская	1
Актюбинская	2
Алматинская	3
Атырауская	4
Восточно-Казахстанская	5
Жамбылская	6
Западно-Казахстанская	7
Карагандинская	8
Кызылординская	9
Костанайская	10
Мангистауская	11
Павлодарская	12
Северо-Казахстанская	13
Южно-Казахстанская	14