

«Сейфуллин окулары–12: Ғылым жолындағы жастар - болашақтың инновациялық элеуеті" атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения–12: Молодежь в науке-инновационный потенциал будущего». – 2016. – Т.І, ч.1. – С. 135-139

ПЕРЕНОС ВИРУСОВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ СЕМЕННОМ РАЗМНОЖЕНИИ

Хасанов В.Т., Сидорик А.И.

Общеизвестным является тот факт, что вирусные заболевания являются основным фактором, снижающим урожайность вегетативно размножаемых культур, в том числе и картофеля. Это связано с характерной способностью вирусов постепенно проникать во все клетки пораженного ими организма, и по мере размножения в нём всё больше угнетать жизнедеятельность растения-хозяина. Вследствие этого, снижение урожайности картофеля от вирусной инфекции может достигать 80% [1].

Темпы вырождения посадок картофеля можно снизить при высокой культуре земледелия, с использованием своевременных фитопрочисток, эффективной борьбы с насекомыми-переносчиками и др. Главным залогом получения высоких урожаев картофеля является высококачественный посадочный материал, который можно получить в результате сортосмены и сортообновления. Однако далеко не всегда даже элитные семена являются свободными от вирусной инфекции по причине недостаточного контроля над чистотой посадочного материала высокочувствительными методами диагностики на вирусоносительство (ИФА, ИХА, ПЦР) [2].

При использовании в селекционном процессе ботанических семян картофеля ситуация с наследованием вирусов далеко не так однозначна, как при вегетативном размножении: в литературе имеются данные о том, что некоторые из вирусов картофеля (PVX, PVS, PVY, ВТМ) могут сохраняться и при генеративном размножении. [3]. Однако встречаются сообщения и о том, что такой способностью они не обладают [4, 5].

В связи с противоречивостью имеющихся литературных данных, изучение закономерностей циркуляции вирусной инфекции при получении семенной репродукции имеет большое значение в селекции картофеля, при получении и размножении свободных от вирусной инфекции новых сортов.

Цель настоящих исследований – изучение особенностей передачи вирусной инфекции картофеля при семенном размножении.

Исследования проводились в лаборатории биотехнологии растений кафедры защиты и карантина растений АО «КАТУ им. С. Сейфуллина» в рамках бюджетной программы 055 МОН РК по проекту: «Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов».

Объекты исследований - сорта казахстанской селекции: Дуняша, Лина Костаная, Костанайские новости, Тустеп, Артем, Коктем-1 и клубни сеянцев

Степана и Лины Костаная, предоставленные лабораторией селекции картофеля ТОО «Костанайский НИИСХ».

В исследованиях применяли следующие методы: иммуноферментный анализ (ИФА), ПЦР-анализ, половая гибридизация сортов картофеля.

Тестирование на пораженность вирусами: PVY (YBK), PVA (ABK), PLRV (BSLK), PVM (MBK), PVX (XBK), PVS (XBK) проводили методом двойного наложения антител («сэндвич» - вариант ИФА) с помощью коммерческих иммуноферментных диагностических наборов ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха по общеизвестной методике [6].

Семена картофеля были исследованы методом классического ПЦР на базе НИИ биотехнологии АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», на наличие Y и M- вирусов картофеля с помощью наборов Агродиагностика «НК-Агро» согласно прилагаемой инструкции в соответствии со стандартной методикой [7].

Искусственное скрещивание сортов картофеля проводили методом декапитации по Дорофееву В.Ф. и др. [8].

На первом этапе наших исследований была проведена диагностика пророщенных клубней изучаемых сортов картофеля на пораженность вирусами.

Тестирование показало, что большинство возделываемых сортов картофеля в селекционно-семеноводческих посадках Костанайского НИИ сельского хозяйства, содержали целые комплексы из 5 или 6 вирусов. Наиболее распространенными оказались PLRV и PVM, наименее – PVA и PVY. Следует отметить, что M-вирус картофеля был обнаружен у всех изучаемых сортов картофеля. В результате проведенных исследований в сеянцах Степана и Лины Костаная был обнаружен только M-вирус картофеля. Данный факт, учитывая общую высокую степень пораженности сортов картофеля, привел нас к гипотезе о неспособности остальных исследуемых вирусов передаваться с семенами.

Для проверки данной гипотезы клубни, пораженные смесью вирусов с наиболее высокой оптической плотностью (таблица 1), были использованы для дальнейшей посадки в открытом грунте.

Таблица 1 – Оптическая плотность ИФА при тестировании ростков семенных клубней картофеля (длина волны 492нм / 620нм)

Сортообразец, №	Экстинция A_{492} , о.е.					
	PVX	PVY	PVS	PVM	PLR V	PVA
Дуняша №2	0.228	1.465	2.063	2.913	0.581	0.967
Лина Костаная №4	0.508	0.537	1.235	0.299	1.163	1.479
Костанайские новости № 4	0.505	0.473	0.436	2.692	0.412	0.697

Артем №2	0.501	0.359	0.784	0.158	0.786	0.39 9
Коктем-1 №2	0,406	0,268	0.368	2.982	0.071	0.13 2
Positive	2.549	1.163	1.127	3.125	1.528	0.73 1
Negative	0.071	0.107	0.069	0.091	0.047	0.02 2

Как видно из таблицы 1, каждый из представленных образцов был поражен смесью вирусов с высокими значениями оптической плотности, что позволяет в сравнении проследить за способностью к их передаче при семенном размножении.

Из отобранных клубней в полевых условиях были выращены растения, от которых в фазу бутонизации-цветения были отделены побеги для проведения искусственного опыления (рисунок 2). Данный метод скрещивания был выбран по причине повышения шансов на образование гибридных ягод, в связи с возможностью проведения эксперимента в изолированных условиях [8].



Рисунок 1 – Верхушки растений с соцветиями сортов картофеля Костанайской селекции, использованные для искусственного опыления

Из 14 опыленных цветков изучаемых сортов картофеля, гибридная комбинация завязались лишь в 5 случаях. Кроме того, была получена одна ягода от естественного самоопыления у Дуняши №2. Ягоды были оставлены на дозревание до достижения полной спелости. Далее семена были извлечены из ягод, высушены и помещены на длительное хранение в условия пониженных температур.

Затем было проведено сравнительное изучение инфицированности клубней и ботанических семян, полученных от материнских растений картофеля методами ИФА и ПЦР.

На данном этапе исследований семена, полученные в изолированных условиях, были протестированы совместно с клубнями собранными от исходных растений (таблица 2).

Таблица 2 - Оптическая плотность ИФА покоящихся семян и клубней исходных растений исследуемых сортов картофеля (длина волны 492нм / 620нм)

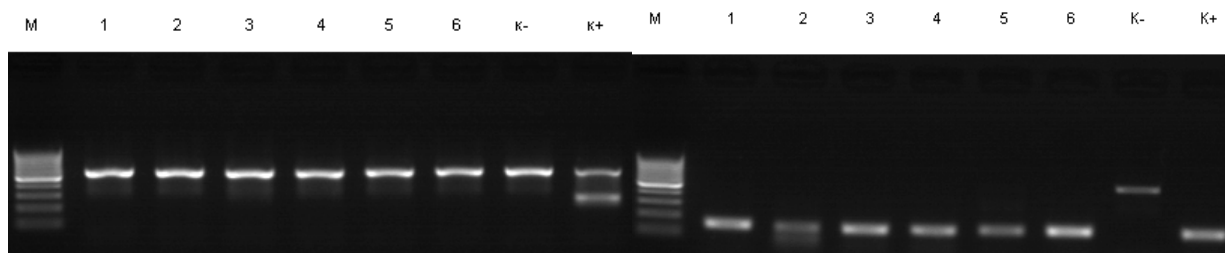
Сортообразец, №		Экстинция A ₄₉₂ , о.е.					
		PVX	PVY	PVS	PVM	PLR V	PVA
Клубни	Дуняша №2	0.117	0.165	0.223	1.472	0.177	0.165
	Лина Костаная №4	0.434	0.519	0.316	1.504	0.264	0.487
	Костанайские Новости №4	0.409	0.209	0.164	1.817	0.185	0.218
	Артем №2	0.370	0.380	0.221	0.679	0.208	0.281
	Коктем-1 №2	0.193	0.283	0.197	1.499	0.178	0.306
Семена	1. ♀ Лина Костаная №4 x ♂ Коктем -1 №2	0.006	0.006	0.021	0.025	0.025	0.057
	2. ♀ Дуняша №2 x ♂ Костанайские Новости №4	0.002	0.073	0.006	0.020	0.003	0.034
	3. ♀ Артем №2 x ♂ Лина Костаная №4	0.007	0.008	0.024	0.019	0.041	0.036
	4. ♀ Коктем-1, 2 x ♂ Артем №2	0.012	0.008	0.014	0,369	0.035	0.044
	5. Дуняша №2 от самоопыления	0.014	0.016	0.036	0.078	0.024	0.059
	6. ♀ Артем №2 x ♂ Коктем – 1 №2	0.005	0.014	0.001	0.011	0.003	0.020
Positive		1.066	0.427	1.455	1.396	1.212	0.879
Negative		0.015	0.020	0.023	0.033	0.018	0.042

Приведенные в таблице 5 результаты ИФА, свидетельствуют о том, что вирусный состав в собранных клубнях картофеля оставался практически неизменным, по сравнению с исходным, за исключением вируса скручивания листьев картофеля, который мог передаваться с помощью насекомых-переносчиков [4].

Оптическая плотность ИФА покоящихся ботанических семян на вирусы X, Y, S, L, A была на уровне отрицательных контролей. М-вирус картофеля удалось обнаружить лишь в покоящихся семенах гибридной ягоды ♀ Коктем-1 №2 x ♂ Артем №2.

В проводимом эксперименте чистота данных ИФА подтверждалась более высокочувствительным методом ПЦР-анализа, позволяющим детектировать вирус в 1 молекуле нуклеиновой кислоты [9].

На рисунке 2 представлены результаты ПЦР-диагностики изучаемых семян на Y- и M-вирусы картофеля.



А - 1-6 – пробы на PVY (размер 241 п.н.)
(размер 160 п.н.)

Б - 1-6 – пробы PVM

М – маркер (GeneRuler 1 kbDNA Ladder); «К+» - положительный контроль;
«К-» - отрицательный контроль; внутренний контроль (ВК) – размер 560 п.н.

Рисунок 2 - Электрофореграмма ПЦР продуктов семян картофеля,
тестируемых на PVY (А) и PVM (Б) в 1,5% агарозном геле

В результате тестирования на наличие Y-вируса картофеля, в соответствии с рисунком 2, было выявлено, что все исследуемые пробы были свободны от данного вируса. При тестировании образцов на наличие M-вируса картофеля все изучаемые образцы показали положительную реакцию.

На заключительном этапе эксперимента из гибридных семян были получены сеянцы, которые также были протестированы методом иммуноферментного анализа через месяц после появления всходов. Результаты тестирования показали, что исследуемые были свободны от исследуемых вирусных заболеваний картофеля.

Список литературы

- 1 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. - М.: Наука, 1993. – 301 с.
- 2 Малько А.М., Анисимов Б.В., Трофимов Н.В. и др. Контроль качества и сертификация семенного картофеля: Практическое руководство. - М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. – 316 с.
- 3 Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля. – Ленинград.: Колос, 1976. – 152 с.
- 4 Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (Практическое руководство). – М.: ФГНУ Росинформагротех, 2004. – 80 с.
- 5 Lack of potato virus-S transmission via true seed in *Solanum tuberosum*/ goth, rw (goth, rw); webb, re (webb, re)// Phytopathology. Volume 65, Issue 12. – 1975. –Р. 1347-1349.
- 6 Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля (рекомендации). – М., 2000.– 76 с.
- 7 Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., и др. Методические указания. Сохранение вегетативно размножаемых культур в in vitro и криоколлекциях. // Методические указания. СПб., ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. – 64 с.

8 Дорофеев В.Ф., Лаптев Ю.П., Чекалин Н.М. Цветение, опыление и гибридизация растений. М.: Агропромиздат, 1990.– С. 42-43.

9 Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ)/Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.//Научное приборостроение.Т. 16, № 3.– 2006. – С. 132-136.