

«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. 139-143

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ИНОКУЛЯЦИИ И НАКОПЛЕНИЯ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ В РАСТЕНИЯХ *DATURA STRAMONIUM*

*Хасанов В.Т., Жумагазина Л.Б.,
Бейсембина Б.*

Вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК) является одним из самых опасных вирусов картофеля и распространен во всех основных зонах возделывания картофеля [1]. ВСЛК - вызывает тяжелое заболевание картофеля и существенно влияет на качество и количество производимых клубней. Снижение урожайности больных растений составляет от 38 до 74% [2, 3].

ВСЛК можно искусственно передать стеблевой прививкой, но с трудом клубневой. Растения нельзя заразить путем механической инокуляции. В природе ВСЛК передается картофелю только тлями, из которых *Myzus persicae* наиболее эффективный и экономически важный переносчик [4].

В настоящее время, в Республике Казахстан, странах СНГ и зарубежных картофелеводчески развитых странах наиболее распространенным методом для массовой диагностики вирусных заболеваний картофеля остается метод иммуноферментного анализа. Одним из основных этапов создания иммунологических тестов для детекции ВСЛК, учитывая векторный способ его передачи, является успешная инокуляция и накопление вируса в тест-растении.

Цель настоящих исследований – изучение особенностей инокуляции и накопления вируса скручивания листьев картофеля в растениях *Datura stramonium* при получении диагностических тестов.

Настоящая работа проводилась на базе лаборатории биотехнологии растений кафедры защиты и карантина растений в рамках Бюджетной программы 055 МОН РК по проекту: «Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов».

Объектами исследования послужили растения *Solanum tuberosum* сорта Артемис, а также растения *Datura stramonium*.

В исследовании применялись следующие методы: отбор проб для тестирования растений на зараженность вирусами; метод иммуноферментного анализа; выращивание тест-растений дурмана в условиях искусственного климата; инокуляция тест-растений ВСЛК.

Для тестирования на вирусоносительство брали молодые физиологически развитые листья со среднего яруса растения в сухую погоду

ранним утром или поздним вечером, по диагонали картофельного поля в количестве 15 штук из 20 кустов в фазу бутонизации–цветения. Пробы упаковывали в пакеты из бумаги, слабо впитывающую влагу. Листовые пробы закладывали в бумажные или полиэтиленовые пакеты, на этикетке указывалась информация (сорт, симптомы поражения, дата сбора и др.) [5].

При постановке ИФА применяли «сэндвич вариант» (метод двойного наслоения антител) согласно стандартной методике [6]. Ячейки 96-луночного полистирольного планшета сенсibilизировали рабочим раствором антител в разведении 20 мкл/10 мл 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 ФСБ и 1 раз ФСБ-ТВ. После этого 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 (сок тестируемых растений) планшет вышеописанным способом для удаления несвязавшегося антигена. Затем в лунки планшета вносили специфический конъюгат в разведении 20 мкл/10 мл 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 в лунки вносили по 0,1 мл раствора субстратной смеси (0,05 М цитратно-фосфатный буфер рН-5,0, ОФД 0,4 мг/мл, 0,01 М H₂O₂). Субстратную смесь вносили по 100 мкл и инкубировали планшет 10-15 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшета раствора 0,5М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света при длине волны 492 нм.

Тест-растения выращивали из семян при температуре 24-25°C на питательном цветочном грунте «Фаско». Лабораторную всхожесть определяли в соответствии со стандартной методикой [7].

Для выращивания тест-растений в условиях защищенного грунта использовалась теплица «ДУМ-2» площадью 18м² с капельным орошением, установленной на территории АО «КАТУ им. С. Сейфуллина».

На первом этапе наших исследований были высеяны семена *Datura stramonium*, лабораторная всхожесть которых составила 57%.

Для выделения вирусов картофеля из растений-накопителей используются листовые материалы. Поэтому на этапе накопления вирусной инфекции важно получить максимум вегетативной массы растений за короткий период.

В этой связи из полученных ботанических сеянцев, была выращена рассада тест-растений и проведена их пикировка.

В проводимых исследованиях в качестве способа инокуляции тест-растений ВСЛК, учитывая векторную передачу данного вируса, была использована прививка (в расщеп) верхушек моноинфицированных вирусами пробирочных растений картофеля сорта Артемис к растениям *Datura stramonium* по Ю.И. Власову [4]. Привоями послужили верхушки пробирочных растений, полученных при введении ростков

моноинфицированных клубней картофеля *in vitro*, подвойми – растения *Datura stramonium* (рисунки 1, 2).

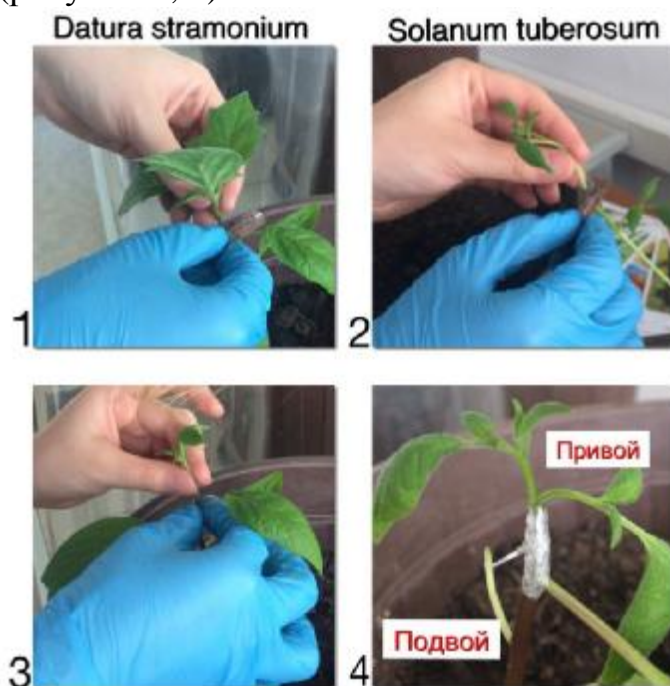


Рисунок 1 - Этапы прививки в расщеп для получения вегетативного гибрида «Дурманокартофель»: 1 - обрезка верхушки растения *Datura stramonium*; 2 - обрезка верхушки *Solanum tuberosum*; 3 - прививка; 4 – полученный гибрид.



Рисунок 2 - Полученные вегетативные гибриды «Дурманокартофеля» с симптомами ВСЛК на листьях на 6-е сутки (слева) и на 30-е сутки (справа)

На полученных вегетативных гибридах «Дурманокартофеля» уже на 6-е сутки были выявлены первые симптомы вирусного заболевания на листьях.

При изучении динамики накопления ВСЛК с помощью метода ИФА в течение 15-80 суток отобранные в разные сроки листовые пробы хранились при +4°C и тестировали одновременно. Исходная относительная концентрация вируса изучалась в единицах оптической плотности – о.е. (таблица 1).

Таблица 1 – Динамика накопления ВСЛК в успешно инокулированных растениях *D. stramonium*, «сэндвич-вариант» ИФА

Тест-растение	№ тест-растения	Источник инфекции, сорт, клон	Способ инокуляции	Экстинция A ₄₉₂ , о.е сутки				
				15-е	20-е	40-е	60-е	80-е
<i>D. stramonium</i>	2	Артемис №9	прививка	0,196	0,402	0,563	0,559	0,593
<i>D. stramonium</i>	3	Артемис №9	прививка	0,262	0,440	0,614	0,587	0,605
positive	-	-	-	0,506	0,506	0,506	0,506	0,506
negative	-	-	-	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015

В соответствии с полученными результатами тестирования, максимальная относительная концентрация ВСЛК, вызывающая системную реакцию растений *D. stramonium*, выявленная на 40-е сутки, оставалась высокой весь период наблюдений, что соответствует данным Гнутовой Р.В. [8].

Известно, что основным показателем, влияющим на выход вирусного препарата является титр вируса в инфекционном соке тест-растения. В этой связи на заключительном этапе наших исследований определялся рабочий титр ВСЛК в инфекционном соке инокулированных растений *Datura stramonium* в «сэндвич-варианте» ИФА (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты изучения рабочих титров вирусов картофеля в инокулированных тест-растениях в «сэндвич-варианте» ИФА

Тест-растение	Титр ВСЛК в тест-растениях									
	Native	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Datura stramonium</i> (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Datura stramonium</i> (3)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Согласно данным таблицы 2, максимальный титр ВСЛК в инфекционном соке инокулированных растений *Datura stramonium* составлял 1:128.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены ботанические сеянцы растений дурмана. Всхожесть семян *Datura stramonium* составила 57%. Установлено, что прививка в расщеп

моноинфицированными пробирочными растениями картофеля сорта Артемис, полученными при введении ростков естественно зараженных клубней картофеля *in vitro* является эффективным способом заражения *Datura stramonium* вирусом скручивания листьев картофеля. Данный способ инокуляции тест-растений позволяет накопить вирусы на 40-е сутки, не снижая концентрацию в течение длительного периода.

Список литературы

1 Yi, Jung Yoon, Lee, Gi-An, Jeong, Jong-Wook; Lee, Sok-young; Lee, Young-Gyu Eliminating Potato Virus Y (PVY) and Potato Leaf Roll Virus (PLRV) Using Cryotherapy of *in vitro*-grown Potato Shoot Tips. Korean Journal of Crop Science // Thomson Reuters – 59, 498-504 (2014).

2[Электронныйресурс] URL:
<http://www.kartofel.org/bolezn/virus/virus.htm> (датаобращения 17.11.2015).

3 Власов Ю. И., Ларина Э. И. В 58 Сельскохозяйственная вирусология.- М.: Колос, 1982.— 239 с.

4 Вирусные болезни и семеноводство картофеля. В 52 Пер. с англ. Т.Н. Теплоуховой и Э.В. Трускинова. Под ред. и с предисл. Ю.И. Власова.- М.: «Колос». 1976, 288 с.

5 ГОСТ Р 53136–2008 Картофель семенной. Технические условия.

6 Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М., 2000. - 76 с.

7 Можаяев Н.И., Аринов К.К., Шестакова Н.А. и др. Практикум по растениеводству. – Астана: КАТУ, 2014. - 309 с.

8 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 301 с.