

«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. 143-146

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ НАКОПЛЕНИЯ И ШТАММОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

*В.Т. Хасанов, А.С. Жанаева,
А.П. Муранец, А.А. Смагулова*

Одним из вредоносных и распространенных вирусов растений на территории СНГ и Республике Казахстан является X-вирус картофеля (PVX). Потери урожая культуры картофеля от PVX может достигать 15% [1].

Известно, что PVX имеет четыре группы штаммов: X₁, X₂, X₃ и X₄. Эти штаммы вызывают на зараженных ими растениях различные симптомы. Все штаммы серологически родственны, однако штаммы одной группы не могут дать перекрестной защиты против штаммов другой группы. Например, растения, зараженные вирусом X₄, восприимчивы к вирусу X₃; растение зараженное вирусом X₂ легко заражается вирусом X₃. Штаммы X₁, X₂ и X₃ вызывают сверхчувствительную реакцию картофеля у определенных сортов, а группа X₄ способна вызывать только межжилковую мозаику. Следовательно штамм X₄ также опасен для сортов, сверхчувствительных к штаммам первых трех групп [2].

Более агрессивные штаммы PVX, такие как X₂ и X₃, накапливаются в растениях быстрее и в большем количестве, нежели штаммы X₁ и X₄, и вызывают более тяжелые симптомы заболеваний. Ученые предполагают, что это связано с тем, что при заражении штаммами X₂ и X₃ в растениях появляется защитная реакция в виде активации деятельности протеазы и гидролазы. Протеазы и гидролазы, наряду с клеточным РНК ограничивают накопление вируса в растениях, однако это приводит к серьезным внутриклеточным изменениям, результатом чего является появление тяжелых симптомов у растений [3].

Цель работы -накопление X-вируса картофеля в растениях *Datura stramonium* и изучение штаммовой принадлежности.

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

Инокуляция и накопление X-вируса картофеля проводили в соответствии со стандартной методикой [4]. В данном эксперименте применялись такие способы инокуляции растений как нанесение инфекционного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля и прививкой в расщеп.

Тестирование на вирусоносительство проводили «сэндвич-вариантом» ИФА в соответствии с общеизвестной методикой [5].

На первом этапе наших исследований проводили отбор моноинфицированных PVX образцов картофеля. Для этого листовые образцы растений различных сортов картофеля, возделываемых в Северном и Центральном Казахстане (Артемис, Фортуна Ягодный-19 Мюзика Акжол Такома Пароли Тамыз Шагалалы Коктем Лина Костаная Алая заря Тустеп, Невский, Розара) были протестированы на 6 вирусов картофеля: PVX, PVY, PVSPVM, PLRV, PVA. В результате тестирования исследуемых образцов на наличие PVX методом ИФА были выделены клоны Артемис №43 и Розара 73 естественно зараженные X-вирусом картофеля. Образцы растений картофеля, содержащие комплексы вирусов были выбракованы.

Далее для инокуляции растений *Daturastramonium* был использован инфекционный сок моноинфицированного клона картофеля Артемис №43.

После инокуляции тест-растений изучали динамику накопления вируса картофеля на 15-80-е сутки. Следует отметить, что листовые пробы, использованные для проверки вирусной инфекции в разные сроки, хранились при +4°C и были протестированы одновременно. Исходная относительная концентрация изучалась в «сэндвич-варианте» ИФА в единицах оптической плотности – о.е. (таблица 1).

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

№ тест-растения	Способ инокуляции	Состав буферного раствора	Экстинция A ₄₉₂ , о.е сутки				
			15-е	20-е	40-е	60-е	80-е
1	прививка	-	0,650	0,572	0,621	0,638	0,584
7	разрез	КФБ, рН=7,4	1,700	1,328	1,416	1,602	1,693
Positive	-	-	1,870	1,870	1,870	1,870	1,870
Negative	-	-	0,013	0,013	0,013	0,013	0,013

Как видно из таблицы 1 максимальная концентрация вируса установлена при использовании способа инокуляции в разрез стебля.

На рисунке 1 представлены симптомы проявления вирусных заболеваний на листьях тест-растений после прививки в расщеп моноинфицированных PVX растений картофеля сорта Артемис (привои) к растениям *Daturastramonium* (подвои). В проводимом эксперименте растения *Daturastramonium* были успешно заражены PVX при использовании обоих способов инокуляции: прививкой и в разрез стебля. Однако на варианте с прививкой (рисунок 1) симптомы начинали появляться уже через неделю на нижних листьях растения, и затем уже на 30-е сутки - на верхних листьях отросшего под привоем побега.

В случае инокуляции PVX в разрез стебля, в соответствии с рисунком 2, симптомы проявлялись уже на 15-е сутки на молодых листьях нового

побега, что подтверждалось также высокой экстинцией в ИФА в данный период.



Рисунок 1 – Полученные вегетативные гибриды «Дурманокarroфеля» с симптомами PVX на нижних листьях на 7-е сутки (слева) и на верхних листьях на 30-е сутки (справа)



Рисунок 2 – Инокулированное в разрез стебля растение *D. stramonium* с симптомами PVX на 15-е сутки

Таким образом, судя по проявлению симптомов вирусной инфекции на листьях *D. stramonium* в виде слабовыраженной пятнистой мозаики или крапчатости предварительно было установлено, что согласно симптоматологической характеристике штаммов X-вируса картофеля [6], изучаемый вирус относится к обычному штамму X₂.

Следует отметить, что относительная концентрация вируса PVX, вызывающая системную реакцию растений *D. stramonium*, выявленная на различные сроки инокуляции, оставалась высокой весь период наблюдений, что также соответствовало литературным данным [7].

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 PVX в инфекционном соке инокулированных растений *Daturastramonium* (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты изучения рабочего титра PVX в инокулированных тест-растениях *Daturastramonium* в «сэндвич-варианте» ИФА

Тест-растение (№)	Титр вирусов в тест-растениях																
	native	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	1:32768
<i>Datura stramonium</i> (7)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Как видно из таблицы 2, предельное разведение сока *D. stramonium*, находилось между 10^{-4} (слабопатогенный штамм X₃) и 10^{-6} (сильнопатогенный штамм X₃), что еще раз подтверждало принадлежность изучаемого вируса к обычному штамму X₂ [6].

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были отобраны моноинфицированные клоны картофеля, определены оптимальные сроки и способы накопления PVX в растениях *Daturastramonium*. Выявлено, что PVX успешно накапливался на 15-е сутки в *D. stramonium* нанесением инфекционного сока на фильтровальную бумагу в продольный разрез стебля растения. Определен рабочий титр PVX в инокулированных тест-растениях в ИФА (1:16384). Установлена принадлежность изучаемого вируса к обычному штамму X₂. Для более точной идентификации штаммовой принадлежности требуется проведение дальнейших исследований на иммунологическом и молекулярно-генетическом уровне.

Список литературы

- 1.[Электронный ресурс]. URL: <http://bibliofond.ru/view.aspx650102>
- 2.Никитин Н.А. Изучение структуры транспортного вирусного рибонуклеопротеида X- вируса картофеля и способов трансляционной активации РНК в его составе.-Москва,2008.-98с.
- 3.Reunov A.V., Lapshina L.A., Nagorskaya V.P. Comparative study of accumulation of two potato virus X strains differing in virulence, hydrolase activity and morphological abnormalities in *Datura stramonium* L. Leaves // Tomson Reuters.-2013.-№161, P. 348-352.
- 4.Атабеков И.Г., Бобкова А.Ф., Нацвлишвили Н.М. и др. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля. - М.- ВАСХНИЛ, 1985. – 20 с.
- 5.Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М., 2000. - 76 с.

6.Блоцкая Ж.В. Вирусные болезни картофеля. - Мн.: Навука і тэхніка, 1993. - С. 63-65.

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