

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.1. - С.226-230

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНОЙ АНТИСЫВОРОТКИ К КАЗАХСТАНСКОМУ ИЗОЛЯТУ М-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

*В.Т.Хасанов, А.И.Сидорик,
Р.М.Турпанова, А.Данияров*

Основной задачей системы семеноводства картофеля является обеспечение производства высококачественным семенным материалом. Одна из главных проблем при этом – контроль распространенности основных фитопатогенных вирусов картофеля.

Поликлональные антисыворотки являются наиболее простым и доступным средством иммунодиагностики на вирусоносительство, прежде всего из-за низкой себестоимости. Также следует отметить, что высокоспецифичные антисыворотки можно использовать сразу же, в реакции капельной аппрепитации, капельной агглютинации или же в очищенном виде, как основной компонент иммуноферментных и иммунохроматрографических диагностикумов [1].

К наиболее распространенным и экономически важным патогенам картофеля относится представитель рода *Carlavirus* семейства *Flexiviridae* – М-вирус картофеля (вирус мозаичного закручивания листьев, Potato virus M, MBK, PVM). Он содержит однонитевую плюс – цепь геномной (г)РНК, длиной приблизительно 8,5 тыс. пар оснований [2]. PVM может вызывать снижение урожайности картофеля от 15% до 45%, и в некоторых регионах посадки поражены им на 100% [3]. В полевых условиях вирус распространяется контактным путем и насекомыми (тлями и полевыми клопами). Вызывает мозаичность, закручивание и волнистость краёв верхних листьев в виде ложечки. Разнообразие симптомов сильно зависит от сорта картофеля и изолята вируса [3, 4]. М-вирус относится к группе среднедействующих иммуногенов вирусов [1].

Целью настоящей работы является получение поликлональных антител, специфичных к казахстанскому изоляту М-вируса картофеля для производства высокочувствительного иммуноферментного диагностикума.

Исследования проводились в лаборатории биотехнологии кафедры защиты и карантина растений АО «КАТУ им. С. Сейфуллина» в рамках бюджетной программы 217 по проекту: «Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов», 2015-2017 гг.

Инокуляция *Solanum lycopersicum* MP1 осуществлялась с помощью укола инфекционного сока в проводящую систему ювенильных растений, шприцем без иглы под давлением. Инокулом получали гомогенизацией сока листьев культуральных растений картофеля сорта Шагдалалы с буферным раствором в соотношении 0,1 г/1 мл. В качестве буферного раствора был

использован буфер для проб и конъюгатов (ПКБ).

Иммуноферментный анализ проводили методом двойного наслоения антител («сэндвич-вариант») по стандартной методике [5, 6] на наиболее распространенные вирусы картофеля: М, Y (PVY, YBK), X (PVX, YBK), S (PVS, SBK), L (PLRV, ВСЛК), А (PVA, АВК). При проведении анализа применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (Красково-1).

Для изучения специфического и неспецифического титров антисыворотки проводили непрямой вариант иммуноферментного анализа по стандартной методике [1]. Неспецифический титр определяли к очищенным антигенам PVS, PVY и к растительному материалу картофеля сорта Орбита, пораженного моноинфекцией PLRV.

Считывание результатов ИФА проводили на спектрофотометре с вертикальным потоком света StatFax 4200 (США) при длине волны 492 нм. Исходная относительная концентрация вирусной инфекции (экстинция) изучалась в единицах оптической плотности – о.е.

ПЦР-диагностику очищенных вирусных препаратов проводили в классическом формате на базе НИИ биотехнологии АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», на наличие X-, Y-, S-, M-, L-, A- вирусов картофеля, а также вирусов имеющих карантинное значение: Андийский вирус крапчатости картофеля (APMoV), Вирус метельчатости верхушки картофеля (PMTV) с помощью наборов Агродиагностика «НК-Агро», согласно прилагаемой инструкции в соответствии со стандартной методикой [7].

Очистку вирусного препарата из листьев *L. esculentum* cv. MP1 проводили по стандартной методике [8], на базе ФГБНУ НИИКХ ИМ А.Г. ЛОРХА.

Для получения поликлональных антисывороток, специфичных к М-вирусу картофеля проводили иммунизацию кроликов вирусным препаратом в 5-6 точек вдоль позвоночника по двум схемам: трехкратной (схема А) и четырехкратной (схема Б) инъекции в дозе 50мкг/мл, на 7-12 сутки после последней инъекции осуществляли отбор крови [9].

Отечественный изолят М-вируса картофеля, названный нами МВК^{Шагалалы}, был обнаружен методами ИФА и ПЦР в культуральном растении сорта картофеля Шагалалы, предоставленного ТОО «Казахский НИИ картофелеводства и овощеводства». Данный клон поддерживается в коллекции изолятов вирусов АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» в культуре *in vitro* [10].

Как известно, выбор растения для размножения и времени накопления вируса в максимальной концентрации существенным образом влияют на результат получения концентрированного препарата вируса из сока больного растения [1].

Согласно литературным данными [1] применение в качестве растений-накопителей М-вируса картофеля применяются различные сорта *Solanum lycopersicum*. Это связано с легкостью отделения компонентов сока от

вирусных частиц, а также сравнительно длительным сохранением вируса в высокой концентрации.

В этой связи, в наших исследованиях для накопления МВК был использован *L.esculentum. cv. MP1*.

В период выращивания зараженного растения была проверена динамика накопления вируса методом иммуноферментного анализа (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика накопления М-вируса картофеля в *L. esculentum. cv. MP1*

Экстинция A ₄₉₂ , о.е. сутки														
15-е			20-е			40-е			60-е			80-е		
Ао	Ао/Ак	**	Ао	Ао/Ак	**	Ао	Ао/Ак	**	Ао	Ао/Ак	**	Ао	Ао/Ак	**
0,029	0,6	-	0,352	7,0	+	0,511	10,2	+	0,461	9,22	+	0,483	9,7	+
Positive			2,474											
Negative			0,050											

Согласно данным таблицы 2 установлено, что вирус обнаруживается на 20-е сутки после инокуляции, сохраняясь длительный период, что согласуется литературными данными [1].

Начальная концентрация вируса в растении во многом определяет конечную концентрацию вируса в препарате[1], в этой связи данный показатель был изучен как в исходном растении *S.tuberosum* сорта Шагала, так и в инокулированном *L. esculentum. cv. MP1* (таблица 3).

Таблица 3 – титр М-вируса картофеля в исходном растении *S. tuberosum* и растении-накопителе *L. esculentum. cv. MP1*

Растение, вид/сорт	Титр вируса, +/-															
	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>S. tuberosum</i> , Шагала	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>L. esculentum. cv.</i> <i>MP1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Значения титра МВК^{Шагала}, отображенные в таблице 3, в инфицированных растениях *S. tuberosum* и *Licopersicum esculentum. cv. MP1* в «сэндвич-варианте» ИФА составили 1: 1024.

Из 150 г. листьев *L. esculentum. cv. MP1* был получен высокоочищенный препарат PVM^{Sh} с высокой степенью чистоты (A₂₆₀/A₂₈₀ 1,2-1,3), коэффициент экстинции - 2,7 мг вируса. Концентрация препарата - 1,5 мг/мл.

На данном этапе исследований была осуществлена проверка полученного вирусного препарата методом классического ПЦР на присутствие PVX, PVY, PVS, PVM, PLRV, PVA, PMTV и APMoV, которая показала наличие только целевого антигена – PVM.

После прохождения проверки вирусный препарат был использован для иммунизации лабораторных кроликов по двум схемам (А, Б). По завершению схем иммунизации были определены специфические и неспецифические

титры антисывороток в непрямом-варианте ИФА (таблица 4).

Таблица 4 - Титры кроличьих антисывороток к PVM^{Sh} в непрямом варианте ИФА

Используемая сыворотка	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
	Специфический (препарат PVM ^{Шагалалы})															
схемы А	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
схемы Б	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
негативная	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Неспецифический (препарат PVS ⁰)															
схемы А	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
схемы Б	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
негативная	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Неспецифический (препарат PVY ^{Ch-2})															
схемы А	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
схемы Б	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
негативная	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Неспецифический (растение картофеля сорта Орбита, PLRV)															
схемы А	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
схемы Б	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
негативная	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Примечание: «+» -, превышение значения оптической плотности 0,1 при A ₄₉₂)																

Согласно данным таблицы 4, неспецифический титр полученных кроличьих антисывороток к вирусным препаратам PVS и PVY, а также к соку растения картофеля, пораженного PLRV не превышал значение отрицательного контроля, рабочий титр к PVM^{Sh} достигал 1:51200 и 1:819200. Таким образом, при использовании схемы иммунизации А титр антисыворотки к PVM^{Sh} в 16 раз превышает титр схемы Б.

Выводы:

1 Методом ИФА установлено, что М-вирус картофеля успешно накапливается в *L. esculentum. cv. MP1* на 20-е сутки, достигая максимальной концентрации на 40-е сутки, сохраняясь в течение 80 дней.

2 Титр МВК^{Шагалалы} в растениях *S. tuberosum* сорта Шагалалы и *Lycopersicon esculentum. cv. MP1* равен 1:1024

3 Получен высокоочищенный препарат PVM^{Sh} из листьев *L. esculentum. cv. MP1* с концентрацией - 1,5 мг/мл.

4 Препарат PVM^{Sh} подтвердил свою моноинфицированность в ПЦР на 8 вирусов.

5 При иммунизации в дозе 50 мкг/мл по трехкратной и четырехкратной схемам получены антисыворотки с титрами в непрямом

ИФА 1:1819200 и 1:51200 соответственно.

6 Реакция полученных антисывороток с различными антигенами (PVS, PVY, PLRV) в непрямом ИФА была на уровне негативной сыворотки (1:200).

Список литературы

1 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – С. 21

2 Kalnciema L, Blake I, Skrastina D, Ose V, Zeltins A.: Potato Virus M-Like Nanoparticles: Construction and Characterization, Molecular Biotechnology, December 2015, Volume 57, Issue 11, pp 982–992., Zavriev SK, Kanyuka KV, Levay KE: The genome organization of potato virus M RNA. J Gen Virol 1991, 72:9-14.

3 Jeffries CJ: FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm: No 19, Potato. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Plant Genetic Resources Institute, Rome 1998.

4 Ruiz de Galarreta JI, Carrasco A, Salazar A, Barrena I, Iturrutxa E, Marquinez R, Legorburu FJ, Ritter E: Wild Solanum species as resistance against different pathogens of potato. Potato Res 1998, 41:57-68

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

6 Контроль качества и сертификация семенного картофеля: Практическое руководство. – М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. – с. 157-174.

7 Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю. и др. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях. // Методические указания. СПб., ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. – 64 с.

8 Атабеков И.Г., Бобкова А.Ф., Нацвлишвилли Н.М. и др. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля. – Москва, 1985. – С.11-12.

9 Отчет о НИР (инв.) № 0216РК01932, № ГР 0115РК00478. Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов // Астана, 2016, 113 с.

10 Данияров А. Ж., Сидорик А. И., Хасанов В.Т., Турпанова Р. М. Оптимизация технологии накопления М-вируса картофеля в культуре изолированных органов растений томатов для получения отечественных диагностических тестов - Вестник Евразийского национального университета им. Л.Н. Гумилева, вып. №6 (115), Астана, 2016, с. 356-364.