

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.359-362

## ПРИМЕНЕНИЕ КУЛЬТУРЫ *PHYSALIS PHILADELPHICA* КАК НАКОПИТЕЛЯ S-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ IN VITRO

Сейдазым А.К., Сидорик А.И.

Вирусные заболевания картофеля являются одними из наиболее вредоносных патогенов. Под влиянием вирусной инфекции ухудшается рост и развитие растений, снижается урожай, качество и товарность клубней.

Обычно накопление вирусной инфекции в семенном материале прогрессирует с увеличением числа полевых репродукций. По этой причине в процессе оригинального, элитного и репродукционного семеноводства классность с каждым поколением снижается на одну ступень [1].

Одним из основных патогенов на картофеле является S-вирус картофеля (Potato virus S, PVS, SBK), который может вызвать потери урожая до 20% [2]

Без применения в элитном семеноводстве картофеля высокочувствительных методов диагностики растений на вирусносительство [ИФА, ИХА, ПЦР] практически невозможно получение высоких урожаев картофеля. Для высокочувствительной и серийной диагностики вирусных заболеваний картофеля, как в странах СНГ, так и за рубежом широко востребованным является метод иммуноферментного анализа (ИФА), особенно «метод двойных антител» («сэндвич-метод») [3].

Известно о применении в качестве тест-растений S-вируса картофеля растений *N.debney*, *Solanum lycopersicum* сорта «Невский», «Перемога», «Колхозный», «Соната» *Chenopodium quinoa*, [4, 5, 6, 7].

Поддержание вируса в культуре изолированных органов и тканей растений является перспективным направлением исследований в деле производства диагностических тестов. В виду того, что вирусы сохраняются в неизменной концентрации в культуральных растениях в течение множества циклов микрклонального размножения, и поэтому они являются доступными круглогодично для получения высокоочищенных вирусных препаратов – основных компонентов создаваемых диагностических тест-систем.

Целью настоящей работы является изучение применения культуры *Physalis philadelphica* как накопителя S-вируса картофеля in vitro.

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.).

Работы с культурой изолированных органов растений проводились с использованием искусственной питательной среды на минеральной основе по Мурасиге и Скугу (МС) [8] в соответствии со стандартной методикой [9].

Для получения стерильной культуры физалиса овощного зрелые плоды подвергали поверхностной стерилизации в мыльном растворе в течение 5 минут и промывке в проточной воде в течение 15 минут. В условиях ламинар бокса плоды погружали в 90% раствор этилового спирта, после чего поджигали над пламенем горелки. Мякоть плода разрезали стерильным скальпелем, извлекали семена и помещали в химические стаканы на искусственную питательную среду МС.

Культуральные растения *Ph. philadelphica* заражали в стерильных условиях ламинар бокса погружая микрочеренки в емкость с инокулюмом на 5 минут, и последующим уколом стерильным шприцем инфекционного сока в стебель растения. В качестве источника вируса для инокуляции использовали гомогенизированные листья инфицированных СВК культуральных растений картофеля сорта Тустеп в стерильном 0,01М фосфатном буфере (рН 7,4) в пропорции 1:1.

Пробы культуральных растений для тестирования на вирусносительство отбирали при пассировании эксплантов на свежую питательную среду.

Иммуноферментный анализ проводили методом двойного наложения антител («сэндвич-вариант») по стандартной методике [10, 11]. Результаты ИФА считывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (Stat Fax 4200, США) при длине волны 492 нм. При проведении анализа применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (Красково-1).

На первом этапе наших исследований был осуществлен перевод семян из зрелых плодов *Ph. philadelphica in vitro* (рисунок 1).





Рисунок 1 – Перенос извлеченных из плодов семян *Ph. philadelphica* на искусственную питательную среду

Результативность данного способа стерилизации отображена в таблице 1.

Таблица 1 – Результативность стерилизации зрелых плодов *Ph. philadelphica* для получения стерильной культуры из ботанических семян.

Количество трансплантируемых на среду МС семян, шт	Выход стерильных семян, шт/%	Выход проросших стерильных семян, шт/%
30	30/100	28/93,3

Согласно данным таблицы 1, 100% извлеченных из обожженных над пламенем спиртовой горелки плодов *Ph. philadelphica* семян были стерильны и обладали всхожестью в 93,3%.

На следующем этапе исследований была осуществлена инокуляция культуральных растений *in vitro* (рисунок 2).



А



Б

В

А, Б – укол эксплантов инфекционным соком

В – эксплант в инокулюме

Рисунок 2 – Инокуляция культуральных растений *Ph. philadelphica in vitro*

По истечению 20 суток после инокуляции методом ИФА была определена зараженность культуральных растений *Ph. philadelphica* S-вирусом картофеля (таблица 2).

Таблица 2 – Результат инокуляции культуральных растений *Ph. philadelphica* in vitro

образец, №			
	Экстинция A <sub>492</sub> , о.е.	Ао/Ак	Р
1.	0,274	3,6	+
2.	0,182	2,4	+/-
3.	0,582	7,7	+
4.	0,340	4,5	+
5.	0,395	5,2	+
Positive	0,958		
Negative	0,076		

Результаты таблицы 2 свидетельствуют о том, что 4 из 5 протестированных растений *Ph. philadelphica* были успешно заражены PVS in vitro.

Таким образом, по предварительным данным, культура *Ph. Philadelphica* может быть успешно использована для накопления S-вируса картофеля in vitro.

### Список литературы

1 Анисимов Б.В, Белов Г.Л. Варицев А. и др. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.

2 Y.-H. Lin, J. A. Abad, C. J. Maroon-Lango et. al. Molecular characterization of domestic and exotic potato virus S isolates and a global analysis of genomic sequences **ARCHIVES OF VIROLOGY** Volume: 159 Issue: 8 Pages: 2115-2122 AUG 2014

3 Горохова Н. Влияние вирусной инфекции на урожайность картофеля. // Биология овощных и плодовых растений и эффективность в применении полимерных пленок в Западной Сибири. – Омск, 1980. – С. 13-17.

4 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. //М., Наука, 1993, 301 с.

5 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

6 Николаева О.В. Современные иммунологические методы в массовой диагностике вирусов растений: обзорная информация. – М.: Наука, 1986. – 52 с.,

7 Бобкова А.Ф., Чирков С.Н. Применение иммуноферментного анализа для диагностики вирусных заболеваний картофеля: обзор // Сельскохозяйственная биология. – 1983. – №5. – С. 32-35

8 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

9 Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Колос, 2006. – 317 с.

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

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

*Научный руководитель:- Хасанов В.Т., к.б.н., доцент*