

АНАЛИЗ ПРОБИРОЧНЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ НА ВИРУСНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ МЕТОДОМ ИФА ДИАГНОСТИКИ

Т. А. Артемьева, магистрант,

Уральский государственный аграрный университет

(Екатеринбург Карла Либкнехта, 42)

М. Ю. Карпухин, доцент кафедры овощеводства и плодородства им. проф. Н.Ф. Коняева,

Уральский государственный аграрный университет

(Екатеринбург Карла Либкнехта, 42)

Рецензент: Н. В. Кандаков, доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Аннотация

В статье описана актуальная на сегодняшний день проблема семеноводства картофеля. Показан современный молекулярный метод для выявления вирусной патологии картофеля. Иммуноферментный анализ как наиболее дешевый и точный метод выявления заболеваний картофеля.

Ключевые слова: картофель, вирусные болезни картофеля, иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР), диагностика, семеноводство.

Summary

The article describes the currently relevant problem of potato seed production. Modern molecular methods for potato viral pathology. The method of alignment by enzyme immunoassay and polymer chain reaction.

Keywords: potato, potato viral diseases, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), polymer chain reaction (PCR), diagnostics, seed farming.

На сегодняшний день, картофель является одной из самых распространенных культур во всем мире, которая широко используется для продовольственных и кормовых целей. Нарастающие объемы производства обуславливают увеличение потребности в качественном семенном материале. Для этого необходимо производство качественного безвирусного семенного материала [6].

Одной из главных причин низкой урожайности картофеля, на территории Российской Федерации, является использование семенного материала, зараженного вирусными, вириодными и бактериальными патогенами. Известно более 100 патогенов, поражающих картофель. Патогены отличаются между собой по вредоносности и величине нанесения экономического эффекта. Потери картофеля от болезней и вредителей составляют, примерно, от 30 до 50 %. Одним из последствий поражения вирусами является постепенное вырождение вегетативно размножаемых сортов картофеля. Вирусные болезни значительно снижают урожайность картофеля. Поражению подвергается как товарный, так и семенной картофель. Вирусные болезни не поддаются лечению и накапливаются в последующих поколениях. Поэтому, первоочередной задачей элитного семеноводства является получение безвирусного посадочного материала [2; 3].

Контроль его качества, начиная с элиты и при последующем продуцировании, и является недостаточно эффективным, поскольку проводится только путем визуальной оценки. Формирование рынка семенного картофеля в России требует улучшить контроль его качества и

сертификации. На сегодняшний день система сертификации оригинального семенного материала предусматривает обязательную лабораторную проверку на зараженность вирусных и бактериальных болезней.

В настоящее время в производстве безвирусного семенного картофеля применяют различные классические методы диагностики: цитологические, серологические, растений-индикаторов и тд.

Наиболее быстрыми и эффективными методами диагностики являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Сегодня в странах с развитым картофелеводством, в том числе и в России, лабораторная диагностика вирусной инфекции осуществляется в основном с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Высокочувствительный метод иммунодиагностики большинства фитопатогенных вирусов, который позволяет обнаружить в образце белковую оболочку вирусов в концентрации 10нг/мл. Важнейшим достоинством этого метода является высокая производительность, которая дает возможность проанализировать большое количество образцов за короткий промежуток времени (2 суток).

Принцип метода ИФА заключается в образовании комплекса между антигенами белка оболочки вирусов с иммобилизованными на твердой фазе и мечеными ферментом специфическими антивирусными иммуноглобулинами (антителами) с последующим выявлением фермента-маркера в реакции с субстратом.

Для диагностики методом ИФА используют наборы для определения X-, S-, M-, Y-, L- вирусов картофеля в листьях, ростках и клубневых индексах «сендвич».

Цель работы: Выявление вирусных заболеваний картофеля методом ИФА диагностики.

Задачи исследования: отбор проб для анализа; проведение анализа в соответствии с методикой; сравнение методов диагностики картофеля.

Место проведения исследования

Работа проводилась в селекционно-семеноводческом комплексе «Уральский картофель», который находится в с. Кочневское, Белоярского района, Свердловской области.

ООО ССК «Уральский картофель» – это один из самых крупных в России предприятий по диагностике и производству оригинального семенного картофеля, который официально был открыт 9 ноября 2018 г. По оснащению лабораторным оборудованием «Уральский картофель» сегодня является один из самых современных селекционных центров.

Компания планирует семеноводство 15-20 сортов картофеля, из которых не менее 60% – сорта собственной селекции и селекции Уральского научно-исследовательского института, еще 40% – сорта российской и зарубежной селекции. При выходе на полную мощность предприятие будет производить десять тысяч тонн элитных семян картофеля в год, что обеспечит потребности уральского округа и других регионов России. В настоящий момент 95% картофеля в России имеет иностранные корни.

Методика проведения опыта

Для проведения работ по диагностике вирусных заболеваний картофеля необходимы специально оборудованные помещения и приборы для проведения анализа.

Принцип метода ИФА заключается в образовании комплекса между антигенами белка оболочки вирусов с иммобилизованными на твердой фазе и мечеными ферментом специфическими антивирусными иммуноглобулинами (антителами) с последующим выявлением фермента-маркера в реакции с субстратом.

Схема постановки анализа представлена на рисунке. На первом этапе на поверхность лунок полистероловых плат сорбируют специфические антитела (LgG) к вирусным антигенам,

затем отмывают избыток антител и вносят тестируемый образец, предположительно содержащий целевые антигены (А) вирусов. После инкубации, приводящей к образованию первичных иммунных комплексов, отмывают несвязавшийся материал и добавляют в лунки конъюгат – ковалентно связанные с пероксидазой хрена (Е) антитела против вирусных антигенов, взаимодействие которого со свободными антигенами вирусов приводит к образованию на стенках лунок «Сэндвича»: антитело-антиген-конъюгат. После тщательной промывки не связавшегося конъюгата проводят ферментативную реакцию с субстратом (S), сопровождающуюся образованием окрашенного продукта в том случае, если в образце содержится целевые вирусные частицы. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию тестируемого вируса в пробе и может быть выражена в единицах оптической плотности с помощью вертикального фотометра (ELISA-ридера) или визуально.

Объектом исследования является картофель. Для анализа были взяты пробирочные растения разных сортов картофеля. В таблице 1 приведена схема проведения опыта.

Таблица 1

Схема проведения опыта

| X | | Y | | M | | L | | S | |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
| VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 |
| 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 |
| 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 |
| 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 |
| 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 |
| 7 | - | 7 | - | 7 | - | 7 | - | 7 | - |
| 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО |
| 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО |

Всего было проверено 13 сортов картофеля. Для исследования было взято по 10 пробирок каждого сорта. Анализ был проведен методом объединенной пробы. Также для диагностики используется положительный и отрицательный контроль.

Таблица 2

Результаты опыта

| X | | Y | | M | | L | | S | |
|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
| VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 | VR | 10 |
| 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 | 1 | 11 |
| 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 14 |
| 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 | 3 | 31 |
| 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 | 6 | 55 |
| 7 | - | 7 | - | 7 | - | 7 | - | 7 | - |
| 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО | 8 | ПКО |
| 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО | 9 | ОКО |

Из таблицы 2 видно, что вирусные патогены проявились только в положительном контроле, в остальных образцах вирусы не обнаружались. Заключение о наличии вирусов составляется визуальным методом.

Заключение

При наличии большого количества разнообразных вирусов, поражающих картофель, проблема защиты картофеля является экономически значимой. Молекулярные методы исследования требуют высокого качества РНК выделяемой из растительных образцов. Использование молекулярных методов может существенно повысить надежность контроля за вирусной инфекцией, своевременно не только установить наличие вирусной инфекции, а также определить ее видовую принадлежность.

Иммуноферментный анализ (ИФА) – это современное лабораторное исследование, в ходе которого специалисты могут обнаружить наличие антител или антигенов к конкретным заболеваниям. Метод анализа ИФА не такой точный как ПЦР, но более дешевый и быстрый. Проводиться при помощи фермента-маркера и сока растения, путем раскапывания в специальные кассеты.

Этот метод диагностики имеет ряд преимуществ, благодаря которым его широко внедряют в различные области сельского хозяйства. Для наиболее качественного анализа в лаборатории используется вальцовый пресс для отбора сока у образцов, подготовленная очищенная вода и вспомогательное оборудование швейцарского и российского производства.

Библиографический список

1. *Адамова А.И., Банадысев С.А., Коновалова Г.И., Семенова З.А.* Технология производства исходного семенного материала картофеля. Картофелеводство. Минск : Мерлит, 2002. Вып. 11.
2. *Анисимов Б.В., Усков А.И., Юрлова С.М., Варицев Ю.А.* Семеноводство картофеля в России: состояние, проблемы и перспективные направления // Достижения науки и техники АПК. 2007. № 7.
3. *Банадысев С.А.* Семеноводство картофеля: организация, методы, технологии. Минск, 2003. 325 с.
4. *Волова Т.Г.* Биотехнология. Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения РАН, 1999. 252 с.
5. *Карпухин М.Ю., Крупский И.Н., Кейта Ф.* Технология возделывания картофеля на Среднем Урале. Екатеринбург : Изд-во Уральского ГАУ, 2016. 15 с.
6. *Карпухин М.Ю., Дунин В.А., Юсупов М.Л., Крупский И.Н., Юшкин Е.М.* Технология производства оригинального, элитного и репродукционного семенного картофеля на Среднем Урале. Екатеринбург : Изд-во Уральского ГАУ, 2019. 92 с.
7. *Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А.* Генетика развития растений / под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. СПб. : Н-Л, 2010. 432 с.
8. *Овэс Е.В.* Методические рекомендации по тиражированию *in vitro* материала для оригинального семеноводства картофеля / ФГБНУ ВНИИКХ; Е.В. Овэс, Б.В. Анисимов, А.И. Усков. М., 2017. 25 с.
9. Стратегия развития селекции и семеноводства сельскохозяйственных культур в Российской Федерации на период до 2020 года. М. : 2010.
10. *Шведченко В.К., Хасанов В.Т., Фида М.А., Бейсембина Б., Харченко П.Н.* и др. Сравнение методов иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени для диагностики зараженности сортообразцов картофеля вирусами // Вестник Российской Академии сельскохозяйственных наук. 2014. № 2.
11. *Шевелуха В.С., Калашикова Е.А., Кочиева Е.З.* и др. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / под ред. В.С. Шевелухи. 3-е изд., перераб. и доп. М. : Высшая школа, 2008. 710 с.