

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ИФА И ПЦР АНАЛИЗА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ВИРУСНОЙ ПАТОЛОГИИ У РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Т. А. Артемьева, магистрант,
Уральский государственный аграрный университет
(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

М. Ю. Карпухин, доцент,
Уральский государственный аграрный университет
(Екатеринбург, ул. Карла Либкнехта, 42)

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

Аннотация

В статье описана актуальная на сегодняшний день проблема семеноводства картофеля. Показаны современные молекулярные методы для выявления вирусной патологии картофеля. Сравнивается метод иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции.

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 detection of viral pathology of potatoes are shown. The method of ELISA and polymerase chain reaction is compared.

Keywords: potato, potato viral diseases, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), polymerase chain reaction (PCR), diagnostics, seed production/

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 [1; 6].

Одной из главных причин низкой урожайности картофеля, на территории Российской Федерации, является использование семенного материала, зараженного вирусными, виридными и бактериальными патогенами. Известно более 100 патогенов, поражающих картофель. Патогены отличаются между собой по вредоносности и величине нанесения экономического эффекта [4,9-11]. 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. [5; 7; 8].

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».

Полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР). Основан на способности нуклеиновых кислот образовывать гибридные молекулы с комплементарной нуклеиновой кислотой. Для того, чтобы выявить вирусные и виroidные заболевания сельскохозяйственных культур, особенно на ранних стадиях, применяют метод ПЦР. Данный метод значительно повышает надежность контроля, так как с его помощью производится анализ генома вируса. Метод ПЦР позволяет определить наличие одной молекулы виroidа (например виroidверетеновидности клубней картофеля – ВВКК) в одной тысяче клеток и более. Известно, что РНК виroidа веретеновидности клубней картофеля представляет собой одонитевидную полинуклеотидную цепь из 341-361 оснований в зависимости от штамма патогенна.

Цель работы: сравнение методов ИФА и ПЦР анализа. Выявление вирусных заболеваний картофеля методом ПЦР 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.

Объектом исследования является картофель. Для анализа были взяты листья с разных растений картофеля одного сорта. Затем листья картофеля поступили в первую зону ПЦР.

Лаборатория ПЦР разделена на три зоны. Первая зона: отбор образцов. Для анализа берут материал листьев или клубней, помещают в специальные промаркированные пробирки. Затем помещают в центрифугу. Полученные образцы помещают в передаточное окно.

Вторая зона: выделение ДНК и раскапывание на вирусы, и бактериальные инфекции. Полученные в первой зоне образцы, отбираю специальными пипетками в чистые промаркированные пробирки. Затем происходит ряд операций, в результате которых получаем образец готовый для раскапывания на вирусы и бактериальные инфекции. Раскапывание осуществляется в специальные кассеты, затем их откручивают на центрифуге для сброса капель и ставят в передаточное окно.

Третья зона: происходит установка, готовых для анализа образцов, в амплификаторы АНК 48, проведение термической реакции и определение зараженности. Затем выдается результат в процентном соотношении.

В таблице 1 приведен пример анализа методом ПЦР диагностики на наличие вирусов в растениях картофеля.

Таблица 1

Анализ листьев на наличие вирусной патологии у растений картофеля методом ПЦР анализа

Позиция	Описание	Тип	Ct FAM	Ct R6G	Ct ROX	Ct Cy5
A1	ПКО1	ПКО1	30,15	33,96	30,7	-
A2	ОКО1	ОКО1	-	34,07	-	-
A3	ОКО-в	ОКО-в	-	34,36	-	-
A4	XУ	ИО	-	34,07	-	-
A5	XУ	ИО	-	34,69	-	-
A6	XУ	ИО	-	34,22	-	-
A7	XУ	ИО	-	33,93	-	-
A8	XУ	ИО	-	33,63	-	-
B1	ПКО1	ПКО1	29,48	31,2	-	32,88
B2	ОКО1	ОКО1	-	-	-	33,67
B3	ОКО-в	ОКО-в	-	-	-	33,68
B4	ML	ИО	-	-	-	33,56
B5	ML	ИО	-	-	-	33,97
B6	ML	ИО	-	-	-	33,49
B7	ML	ИО	-	-	-	33,3
B8	ML	ИО	-	-	-	33,49
C1	ПКО1	ПКО1	32,83	34,45	34,58	-
C2	ОКО1	ОКО1	-	34,69	-	-
C3	ОКО-в	ОКО-в	-	34,69	-	-
C4	SA	ИО	-	34,42	-	-
C5	SA	ИО	-	34,87	-	-
C6	SA	ИО	-	34,58	-	-
C7	SA	ИО	-	34,22	-	-
C8	SA	ИО	-	33,76	-	-

Из таблицы один мы видим, что вирусы содержатся только в варианте с положительным

контролдем (ПКО)

В таблице 2 приведен пример анализа методом ИФА на наличие зараженности вирусными заболеваниями растений картофеля.

Таблица 2

**Анализ листьев на наличие вирусной патологии
у растений картофеля методом ИФА анализа**

Описание	X	Y	M	L	S
ПКО	+	+	+	+	+
ОКО	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-

Из таблицы два мы также видим, что ДНК вируса находится только в варианте с положительным контролем.

Результаты исследования и их обсуждения

1. Результатом эксперимента является определение РНК вирусов X и Y картофеля в исследуемых образцах в присутствии внутреннего положительного контроля.

В случае обнаружения положительных результатов по каналу детекции FAM и/или R6G в ОКО или ОКО-В результат анализа всех проб нельзя считать достоверным. Требуется повторить анализ проб.

Рост по каналу R6G является внутренним контролем прохождения реакции полимеразной цепной реакции и качества выделения РНК из образца. Рост флуоресценции по этому каналу в отсутствии роста по каналу FAM и R6G свидетельствует об отсутствии РНК патогенов в выделенных образцах. Отсутствие роста флуоресценции, сильное отставание по Ct или измененная форма кривой свидетельствует о наличии ингибиторов в выделенной РНК.

Рост флуоресценции по каналу FAM свидетельствует о присутствии РНК Potatovirus X (PVX) в образце. Рост флуоресценции по каналу ROX свидетельствуют о присутствии РНК Potatovirus Y (PVY) в образце. Из таблицы 1 мы видим, что вирусы X и Y в образцах не обнаружены.

2. Результатом эксперимента является определение РНК вирусов M и L картофеля в исследуемых образцах в присутствии внутреннего положительного контроля.

В случае обнаружения положительных результатов по каналу детекции R6G и/или ROX в ОКО или ОКО-В результат анализа всех проб нельзя считать достоверным. Требуется повторить анализ проб.

Рост флуоресценции по каналу Cy5 является внутренним контролем прохождения полимеразной цепной реакции и качества выделения РНК из образца. Рост флуоресценции по этому каналу в отсутствии роста по каналу FAM и R6G свидетельствует об отсутствии РНК патогенов в выделенных образцах. Отсутствие роста флуоресценции, сильное отставание по Ct или измененная форма кривой свидетельствует о наличии ингибиторов в выделенной РНК.

Рост флуоресценции по каналу R6G свидетельствует о присутствии РНК Potatovirus M

(PVM) в образце. Рост флуоресценции по каналу FAM свидетельствуют о присутствии РНК PotatoleafrollvirusL (PLRV) в образце. Из таблицы мы видим, что вирусы М и Lв образцах не обнаружены.

3. Результатом эксперимента является определение РНК вирусов S и A картофеля в исследуемых образцах в присутствии внутреннего положительного контроля.

В случае обнаружения положительных результатов по каналу детекции FAM и/или R6G в ОКО или ОКО-В результат анализа всех проб нельзя считать достоверным. Требуется повторить анализ проб.

Рост по каналу R6G является внутренним контролем прохождения реакции полимеразной цепной реакции и качества выделения РНК из образца. Рост флуоресценции по этому каналу в отсутствие роста по каналу FAM и R6G свидетельствует об отсутствии РНК патогенов в выделенных образцах. Отсутствие роста флуоресценции, сильное отставание по Ct или измененная форма кривой свидетельствует о наличии ингибиторов в выделенной РНК.

Рост флуоресценции по каналу FAM свидетельствует о присутствии РНК PotatovirusS (PVS) в образце. Рост флуоресценции по каналу ROX свидетельствуют о присутствии РНК PotatovirusA (PVA) в образце. Из таблицы 1 мы видим, что вирусы S и A в образцах не обнаружены.

4) Результаты по диагностике методом ИФА анализа определяются зрительным методом по окраске лунок планшета в ярко-оранжевый цвет.

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.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) – является одним из самых эффективных и прогрессивных методов диагностики заболеваний, он более точный и намного сложнее.

Преимуществом данного подхода является возможность количественного определения специфической последовательности нуклеиновых кислот в образце после каждого цикла амплификации.

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., Калашиникова 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.