

УДК 635.24:632.937.16:576.8.077

КУЛЬТУРА ТКАНИ *NICOTIANA TABACUM* КАК ИСТОЧНИК Y-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

В.Т. Хасанов¹, Я.И. Алексеев², Н.Ю. Минакова², Г.К. Оразбаева¹, Б. Бейсембина¹, М.А. Фида¹

¹Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, пр. Победы, 62, Астана, 010000, Казахстан

²Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, ул. Тимирязева, 42, Москва, 127550, Россия

vadim_kazgatu@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Поиск альтернативных подходов к технологии накопления и очистки вирусов картофеля с целью оптимизации методики их выделения является весьма актуальным. Получение и наращивание каллусной ткани растений с одновременным накоплением в ней вируса дает возможность длительно сохранять материал в условиях *in vitro*, исключающих заражение другим вирусом. Кроме того, выделение вирусных антигенов из каллусной ткани позволяет получить высокоочищенные препараты ввиду отсутствия многих специфических белков, а также иметь достаточное количество антигена независимо от времени года.

Целью наших исследований являлось накопление Y-вируса картофеля в растительных тканях для дальнейшего выделения и очистки вирусного антигена и получения специфических антител. Соответственно, объектом исследований послужил Y-вирус картофеля. В качестве накопителя Y-вируса картофеля использовали растения *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*.

В статье представлены результаты получения вирусного антигена картофеля PVY из каллусных культур *Nicotiana tabacum*. Установлено, что полученный каллусный материал из предварительно проинкулированного PVY растения *Nicotiana tabacum* способен накапливать и длительно сохранять в себе вирус PVY. Методом ИФА и ПЦР-РВ подтверждена чистота коммерческого вирусного препарата, а также возможность сохранения PVY в пробирочных растениях картофеля сорта *Cherie*, инокулированных растениях *Nicotiana tabacum*, каллусе и индуцированных из него растениях-регенерантах. На заключительном этапе эксперимента были получены специфичные к PVY мышиные поликлональные антитела, которые вступали в реакцию с антигеном в ИФА с титром - 1/6400.

Ключевые слова: Y-вирус картофеля (PVY), *Nicotiana tabacum*, антитела, антиген, каллус, иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ), титр антител.

NICOTIANA TABACUM TISSUE CULTURE AS A SOURCE OF POTATO VIRUS Y.

V.T. Khasanov¹, Ya.I. Alekseev², N.Yu. Minakova², G.K. Orazbaeva¹, B. Beisembina¹, M.A. Fida¹

¹S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, 62 Prospect Pobedy, Astana, 010000, Kazakhstan

²Institute of Agricultural Biotechnology, 42, Timiryazeva, Moscow, 127550, Russian Federation

vadim_kazgatu@mail.ru

ABSTRACT

Finding alternative approaches to the technology of storage and purification of potato viruses in order to optimize the methods of their isolation is topical.

In vitro cultivation of plant callus tissue with simultaneous accumulation of a virus allows its long time accumulation, precluding other virus's infection. Besides, the isolation of viral antigen from callus tissue provides a highly purified antigen due to absence of many specific proteins and enough amount of antigen all year round.

The purpose of our research was accumulation of potato virus Y (PVY) in plant culture tissues for further isolation and purification of viral antigen and producing specific antibodies. Accordingly, the potato virus Y

was chosen as a focus of the research. Object of the research, *Nicotiana tabacum* Samsun variety served to accumulate the virus.

This article presents results of potato virus Y (PVY) accumulation in *Nicotiana Tabacum* tissue culture and its further purification. Capability of culture tissue produced from PVY-inoculated plant (*Nicotiana Tabacum*) to accumulate and maintain viral infection for a long time was ascertained. Purity of commercial viral preparation, as well as PVY maintaining possibility *in vitro* in *Cherie* potato plant, inoculated plants of *Nicotiana tabacum* and callus induced from its regenerated plants in our research were proved using ELISA and PCR in real time. In another study, mouse polyclonal antibodies specified to the virus were produced and reacted with a 1/6400 titer of antigen.

Keywords: Y-potato virus (PVY), *Nicotiana tabacum*, antibodies, antigen, callus, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), PCR-method, antibody titer.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель в Казахстане является одним из основных продуктов питания и по своей значимости занимает второе место после хлеба [1].

Урожайность данной культуры во многом зависит от устойчивости сортов картофеля к грибным, вирусным и бактериальным заболеваниям картофеля [2]. Вирусы, являясь внутриклеточными патогенами, способны изменять метаболизм растений, вызывать вырождение картофеля, которое характеризуется резким снижением урожая, ухудшением пищевой и сырьевой ценности клубней.

К числу наиболее патогенных вирусов на картофеле относится Y-вирус, вызывающий полосчатую и морщинистую мозаики. Среди вирусов эти заболевания являются наиболее вредоносными, снижающими урожай на 30-70%. Без применения в семеноводческой практике методов диагностики растений на вирусносительство практически невозможно получение высоких урожаев картофеля. Ключевым звеном при разработке современных методов диагностики и внедрении их в сельскохозяйственную практику является наличие качественного антигена. Как известно, высокоочищенные вирусные антигены, которыми иммунизируют животных, применяются для производства специфических антител. В то же время специфические антитела являются важными компонентами диагностических наборов для проведения иммунодиагностики.

В связи с этим поиск альтернативных подходов к технологии накопления и очистки вирусов картофеля с целью оптимизации методики их выделения является весьма актуальным. Одним из таких подходов может служить использование каллусной ткани растений-накопителей в качестве источника для получения вирусных препаратов.

Технология *in vitro* позволяет получать экологически чистое сырье круглый год, увеличивать выход биологически активных веществ, вирусных препаратов и регулировать их накопление в культуре ткани. В качестве источника вирусоспецифических антигенов отдельные авторы используют каллусные культуры. Получение и наращивание каллусной ткани растений с одновременным накоплением в ней вируса дает возможность длительно сохранять материал в условиях *in vitro*, исключая заражение другим вирусом. Кроме того, выделение вирусных антигенов из каллусной ткани позволяет получить высокоочищенные препараты ввиду отсутствия многих специфических белков, а также иметь достаточное количество антигена независимо от времени года [3, 4, 5, 6].

Целью наших исследований являлось накопление Y-вируса в растительных тканях для дальнейшего выделения и очистки вирусного антигена и получения специфических антител.

Настоящие исследования проводились в ТОО «НИИ сельскохозяйственной биотехнологии» АО «КАТУ им. С. Сейфуллина» в рамках бюджетной программы 055 «Научные и /или научно-техническая деятельность» по проекту «Разработка экспресс-теста для диагностики вирусных заболеваний картофеля».

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований послужил Y-вирус картофеля. В качестве накопителя Y-вируса картофеля использовали растения *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*. Тест-растения выращивали из семян на биогумусе «Живая земля» с почвогрунтом в соотношении 1:1. Выращивание растений проводилось при постоянном освещении с интенсивностью 1000 лк, при температуре 24-25°C.

Растения инокулировали по стандартной методике [6]. Для получения инфекционного сока при инокуляции тест-растений использовали пораженные моноинфекцией PVY растения картофеля сортов *Cherie* и *Ditta*. Инокулированные растения затеняли на сутки, после чего они содержались на рассеянном свете.

Через 20-25 суток после инокуляции верхние молодые листья, содержащие вирус PVY, отделяли, промывали дистиллированной водой и дезинфицировали, последовательно инкубируя их в 20% эталоне (1 мин.), 5% растворе хлорной извести (15 мин.) и 5% растворе хлорамина (20 мин.). Листья затем 3 раза отмывали стерильной водой и разрезали на сегменты квадратной формы размером 0,5-0,7 см [4].

Экспланты высаживали в чашки Петри с агаризованной питательной средой на минеральной основе по Мурасиге и Скугу, содержащей наряду со стандартными ингредиентами следующие компоненты: кинетин – 2 мг/л, 2,4-Д – 0,5 мг/л, индолилуксусная кислота – 1 мг/л, сахароза – 2% и агар-агар – 0,7% [4]. Инкубация каллуса в течение первого периода проводилась при постоянном освещении (1500 лк), при последующем пассировании каллусную ткань культивировали в термостате при температуре 25-26°C.

При культивировании каллусной ткани проводились наблюдения за интенсивностью ее нарастания. Для этого в процессе пассирования каллусную массу стерильно взвешивали на электронных весах. Интенсивность роста (ИР) каллусной ткани рассчитывали по следующей формуле (1):

$$\text{ИР} = \frac{\text{Сырая масса 2} - \text{Сырая масса 1}}{\text{Сырая масса 1}} * 100 \quad (1)$$

где сырая масса 1 – вес каллусной ткани в начале пассажа;
сырая масса 2 – вес каллусной ткани в конце пассажа.

$$\text{Growthrate} = \frac{\text{Raw mass 2} - \text{Raw mass 1}}{\text{Raw mass 1}} * 100,$$

Raw mass 2 – the weight of callus tissue at the beginning of the passage;

Raw mass 1 – the weight of callus tissue at the end of the passage.

Растения-регенераты размножали методом черенкования *in vitro* и культивировали на жидкой безгормональной питательной среде на минеральной основе по Мурасиге и Скугу, включающей 2% сахарозы, при 5000-10000 лк, температуре 20-25°C, относительной влажности воздуха 60-70%, 16-часовом фотопериоде.

Накопление вируса в тест-растениях и их каллусной ткани контролировали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). При проведении анализа применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (п. Коренево). Для иммунологической проверки растений на вирусносительство применялся метод двойного наслоения антител («сэндвич» вариант) ИФА по стандартной методике [5, 6]. Наличие вируса в исследуемых

образцах регистрировали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света ASYS Expert 96 (Австрия), при длине волны 490 нм.

Сортообразцы тест-растений также анализировались методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной биотехнологии на наличие вирусов PVX, PVY, PVM, PLRV по стандартной методике [7]. РНК из образцов была выделена с помощью набора «Проба НК» (Агродиагностика) согласно инструкции производителя. Для проведения анализа на содержание возбудителей использовали прототипы наборов реагентов для ПЦР в реальном времени, производства ГНУ ВНИИСБ и ЗАО «Синтол» [8].

Вирусные препараты получали из каллусных тканей, выращенных в условиях постоянного освещения после 2-3 пассажей. Очистку проводили двумя способами.

В первом случае получали слабоочищенный препарат. С этой целью ткань гомогенизировали, отжимали через два слоя марли, добавляли 10% хлороформа от объема полученного сока и подвергали низкоскоростному центрифугированию (3000 об./мин, 10-15 мин). Надосадочная жидкость являлась иммуногеном, которым затем иммунизировали мышей для выработки антител, специфичных к Y-вирусу картофеля [6].

Во втором случае высокоочищенный препарат получали в ГНУ ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха Российской академии сельскохозяйственных наук [6]. Очистку проводили ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы по методике, принятой в отделе биотехнологии и иммунодиагностики [6, 10].

Концентрацию вирусных препаратов определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм на приборе SmartSpec Plus, BioRad, США, используя при этом коэффициент экстинкции – 2,35 [11, 12].

Для получения позитивных поликлональных сывороток лабораторных белых мышей иммунизировали по следующей схеме: на 1-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки животным вводили внутрибрюшинно 0,1 мл очищенного вирусного антигена в концентрации 1 мкг/мл в забуференном физиологическом растворе, pH 7,2-7,4 [13].

На 25-е сутки иммунизации отбирали пробы крови для определения рабочего титра, тестирование проводилось непрямой метод иммуноферментного анализа. На 54-е сутки после 1-й иммунизации мышей реиммунизировали – 0,1 мл (1 мкг/мл) антигена и на 59-е сутки проводили тестирование и полный отбор крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первый этап – инокуляция тест-растений Y-вирусом. Для приготовления инфекционного сока использовали больные растения с четкими симптомами заболеваний. Кроме того, зараженность исходных растений подтверждалась с помощью «сэндвич» варианта ИФА (таблица 1).

В наших исследованиях использование инфекционного сока, полученного от растений картофеля сорта *Cherie*, культивируемого *in vitro* для инокуляции тест-растений, оказалось более эффективным, чем от растений картофеля сорта *Ditta*, выращиваемое *in vivo*.

Таблица 1. Зараженность растений картофеля PVY для инокуляции тест-растений

Table 1. PVY infected potato plants, as an inoculum of test plants

№ п/п Samples' №	Сортообразец, зараженный вирусом Samples infected by virus	Оптическая плотность в ИФА, ед. Optical density ELISA units.
1	Пробирочное растение картофеля сорта <i>Cherie</i> Potato test-tube plant variety <i>Cherie</i>	1,608

2	Растения картофеля сорта <i>Ditta</i> №2, выращиваемое в лабораторных условиях Potato plant <i>Ditta</i> №2, <i>in vivo</i>	1,015
3	Positive	1,308
4	Negative	0,017
m, %		1,08
НСР (05) The least significant difference (05)		0,03

Через 14 дней у инокулированных растений *Nicotiana tabacum* наблюдалось появление первых симптомов заражения вирусом: посветление жилок, деформация листьев, легкая крапчатость, травмированные листья становились прозрачными и усыхали. Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют о том, что положительная реакция была выявлена у шести линий табака.

Таблица 2. Результаты тестирования заражённых растений *Nicotiana tabacum* PVY

Table 2. ELISA results of PVY infected *Nicotiana tabacum*

№ линии Line №	Растение, сорт Plan, variety	Значения оптической плотности в ИФА после заражения растений, ед. ELISA optical density of infected plants in units.		
		на 7-е сутки In 7 th day	на 15-е сутки In 15 th day	на 25-е сутки In 25 th day
10	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,008	0,826	1,335
38	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,003	1,313	0,767
42	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,571	1,211	0,936
43	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,497	1,070	0,977
44	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,102	0,751	0,232
1000	<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Samsun</i>	0,180	0,412	0,343
-	Positive	0,865	1,021	0,912
-	Negative	0,019	0,023	0,021
m, %		3,69	0,96	1,20
НСР (05) The least significant difference (05)		0,01	0,02	0,02

При регистрации наличия в тест-растениях вируса методом ИФА было установлено, что оптическая плотность анализируемых образцов: №38, 42, 43 превышала коммерческий положительный контроль уже на 15-е сутки после инокуляции, что соответствует данным Гнутовой Р.В. [3]. Следует отметить, что на 25-е сутки оптическая плотность ИФА вышеуказанных инфицированных линий заметно снижалась. Однако линия *Nicotiana tabacum* №10 проявляла максимальное накопление вируса PVY именно на 25-е сутки после инокуляции.

Таким образом, на первом этапе наших исследований проведена инокуляция растений табака, идентифицированы изучаемые вирусы картофеля и отобраны инфицированные линии для последующего введения тест-растений *in vitro* и культивирования PVY в культуре каллусных тканей.

Второй этап – индукция каллусных культур из инфицированных тест-растений. Для индукции каллуса использовали растения *Nicotiana tabacum* – сорт *Samsun* линии №10, так

как оптическая плотность ИФА у данной линии была наибольшей по сравнению с другими вариантами. Через десять дней после индукции примерно 95% эксплантов образовали первичный каллус. Затем первичный каллус пересаживали на свежие питательные среды того же состава и при нарастании каллусной массы большего объема на 3-4 неделю производили последующее пассирование. За время эксперимента было осуществлено 4 пассажа (рисунок 1).

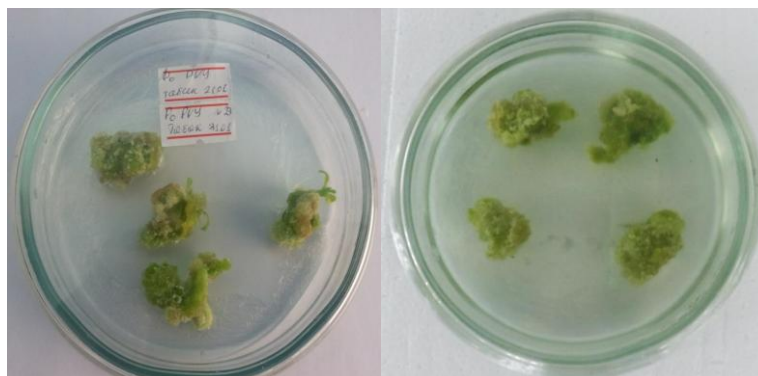


Рис. 1. Нарастание каллусной ткани *Nicotiana tabacum* *in vitro*

Fig. 1. Growing up callus tissue of *Nicotiana tabacum* *in vitro*

Учет интенсивности роста инфицированных PVY каллусных культур *N. tabacum* в процессе пассирования на 14-е сутки культивирования составил 107%.

В процессе культивирования каллуса на питательной среде Мурасиге и Скуга образовались растения-регенеранты, которые были пересажены на жидкую безгормональную среду для микрочеренкования в соответствии с рисунком 2.



Рис. 2. Растения-регенеранты табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun*, индуцированные из культуры каллусной ткани

Fig. 2. *Nicotiana tabacum* regenerated plants variety *Samsun*, induced from callus tissue culture

Методом ИФА вирус PVY был обнаружен во всех исследуемых каллусных культурах, полученных из инфицированных нами растений, на всех этапах пассирования. Кроме того, индуцированные из каллуса 3 растения-регенеранта также показали оптическую плотность ИФА, превышающую положительный контроль (таблица 3).

Таблица 3. Результаты тестирования каллусных тканей и растений-регенерантов *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun* на вирусоносительство методом ИФА на 30-е сутки

Table 3. PVY-infected *Nicotiana tabacum* variety *Samsun* tissue culture and its regenerated plants optical density in ELISA on the 30th day

№	Растительные образцы, зараженные PVY Plant samples were infected with PVY	Оптическая плотность ИФА, ед. ELISA optical density, units.
1	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №1 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №1	0,709
2	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №2 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №2	0,256
3	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №3 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №3	0,291
4	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №4 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №4	0,578
5	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №5 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №5	0,371
6	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №1 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №1	0,438
7	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №2 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №2	0,362
8	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №3 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №3	0,409
9	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №4 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №4	0,520
10	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №5 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №5	0,461
11	Positive	0,375
12	Negative	0,014
	m, %	1,22
	НСР (05) The least significant difference (05)	0,01

Следует отметить, что при последующих тестированиях каллусных культур линии *Nicotiana tabacum* №10 в течение 4-х пассажей, также как и растений-регенерантов в течение 4-х и более циклов черенкования *in vitro*, оптическая плотность ИФА всегда оставалась на уровне положительного контроля, а иногда и несколько превышала его (таблица 4).

Таблица 4. Результаты тестирования каллусных тканей и растений-регенерантов *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun* на вирусоносительство методом ИФА на 60-е сутки

Table 4. PVY-enfected *Nicotiana tabacum* variety *Samsun* tissue culture and its regenerated plants optical density in ELISA on the 60th day

№	Растительные образцы, зараженные PVY Plant samples were infected with PVY	Оптическая плотность ИФА, ед. ELISA optical density, units.
1	Каллусная ткань, полученная от линии N.t. №10, образец №1 Callus tissue derived from the line N.t. №10, sample №1	0,284
2	Растение-регенерант от каллуса линии N.t. №10, образец №1 Regenerated plants obtained from callus line N.t. №10, sample №1	0,318
3	Positive	0,287
4	Negative	0,012
m, %		4,14
НСР (05) The least significant difference (05)		0,04

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о возможности длительной персистенции и накопления в культуре каллусной ткани и растениях-регенерантах *Nicotiana tabacum* вируса PVY, что согласуется с литературными данными.

Третий этап – получение вирусных препаратов из культуры тканей. Наличие собственных вирусных препаратов во многом упрощает работу по получению поли- и моноклональных антител при создании диагностических тест-систем, исключает зависимость от коммерческих фирм производителей очищенных вирусных препаратов картофеля.

В проводимых исследованиях полученные из каллусных культур *N. tabacum*, слабоочищенный (препарат 1) и высокоочищенный (препарат 2) антигены PVY исследовали в ИФА в сравнении с положительным (Positive – коммерческий очищенный вирус PVY) и отрицательным (Negative – растительный экстракт безвирусного картофеля) контролем. Результаты оценки на вирусоносительство исследуемых препаратов методом ИФА представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты изучения антигена PVY в «сэндвич» варианте ИФА

Table 5. Antigen preparation test result in "sandwich ELISA"

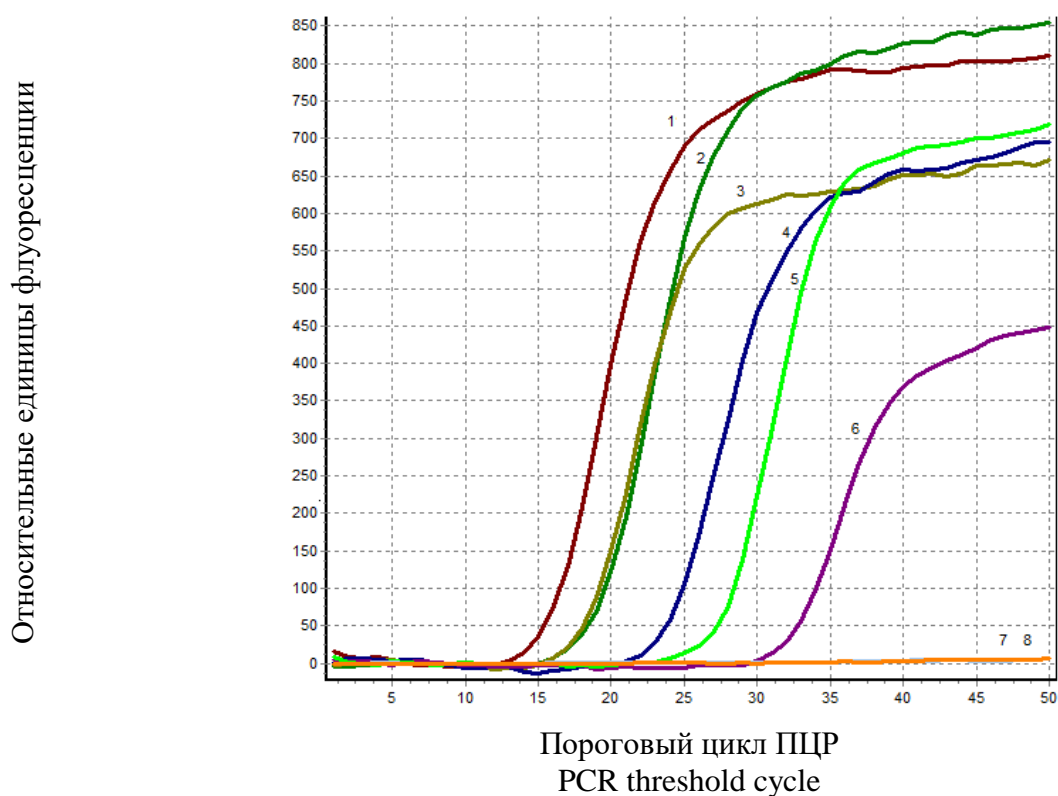
№	Препарат Preparation	Оптическая плотность ИФА, ед. ELISA optical density, units.
1	Препарат-1 Preparation-1	0,284
2	Препарат-2 Preparation-2	0,922
3	Positive	1, 087
4	Negative	0,033
M, %		0,93
НСР (05) The least significant difference (05)		0,02

По результатам исследования выделенных и очищенных нами вирусных препаратов удалось выявить, что оптическая плотность исследуемых антигенов в ИФА находилась на достаточно высоком уровне.

В целях чистоты эксперимента, а также внешней проверки используемых в наших исследованиях пробирочных растений картофеля сорта *Cherie*, послуживших донором вируса PVY, растений-накопителей – *Nicotiana tabacum*, индуцированного из них каллуса, а также используемого коммерческого вирусного препарата PVY⁰ проводили их детекцию на вирусы: PVX, PVY, PVM, PLRV методом ПЦР-РВ.

При постановке ПЦР-РВ исследовались растительные образцы для выделения одинаковой массы и объема. В коммерческих вирусных препаратах использованы разведения исходной концентрации вируса – 2,2 мг/мл в 1000 – Y (3) и 1 000 000 – Y (6) раз. При этом следует считать, что чем меньше цикл, тем больше вирусной РНК в образце.

Результаты проверки образцов на зараженность вирусами показали, что все образцы были заражены вирусом PVY (рисунок 3).



1 – растение-регенерант *Nicotiana tabacum* PVY (*in vivo*); 2 – каллус *Nicotiana tabacum* PVY (*in vitro*); 3 – сорт картофеля *Cherie in vitro*, пораженный PVY; 4 – Y (3) – коммерческий вирусный препарат PVY; 5 – ПКО PVY – положительный контрольный образец на PVY; 6 – Y (6) – коммерческий вирусный препарат PVY; 7 – ОКО-В – отрицательный контроль выделения; 8 – ОКО

Рис. 3. Результаты проверки образцов картофеля и табака на PVY ПЦР-РВ

1 – regenerated plants of *Nicotiana tabacum* PVY (*in vivo*); 2 – callus *Nicotiana tabacum* PVY (*in vitro*); 3 – PVY infected potato variety *Cherie in vitro*; 4 – Y (3) – commercial viral preparation PVY; 5 – positive control for PVY; 6 – Y (6) – commercial viral preparation PVY; 7 – negative control; 8 – negative control

Fig. 3. RT-PCR Results for potato and tobacco samples PVY

На рисунке 3 показано, что у варианта 1 – растение-регенерант *Nicotiana tabacum* PVY (*in vivo*), на 16 цикле идет накопление продуктов амплификации; вариант 2 – каллус *Nicotiana tabacum* PVY (*in vitro*) на 18 цикле; 3 – сорт картофеля *Cherie in vitro*, пораженный

PVY на 17 цикле; 4 – Y (3) – коммерческий вирусный препарат PVY на 24 цикле амплификации; 5 – ПКО PVY – положительный контрольный образец на PVY на 27 цикле амплификации; 6 – Y (6) – коммерческий вирусный препарат PVY на 33 цикле амплификации; 7 – ОКО-В – отрицательный контроль выделения и ОКО, сработали должным образом, не проявив флуоресцентную активность. При постановке ПЦР-РВ были использованы фильтры оптической плотности FAM активный к генам вируса PVY, а также R6G активный к вирусу PVX, канал Cy5 служил ВПК.

В таблицах 6, 7 приведены значения порогового цикла ПЦР-РВ. Согласно проведенному ПЦР-анализу, вирусы PVX, PVM, PLRV в изучаемых сортообразцах обнаружены не были.

Таблица 6. Тестирование сортообразцов картофеля и табака на содержание PVY и PVX методом ПЦР-РВ

Table 6. Test result of potato and tobacco samples for PVY and PVX infection in PCR-RT

Образец Sample	Ct R6G PVY	Ct FAM PVX	Cy5 ВПК
Растение-регенерант <i>Nicotiana tabacum</i> PVY <i>Nicotiana tabacum</i> PVY, regenerated plant	14,53	<50	34,02
Каллус <i>Nicotiana tabacum</i> PVY <i>Nicotiana tabacum</i> PVY, Callus	17,84	<50	33,52
Сорт картофеля Cherie in vitro Potato in vitro, variety Cherie	17,17	<50	34,2
Y (3) – коммерческий вирусный препарат PVY Y (3) – Virus commercial antigen PVY	22,73	<50	34,38
Y (6) - коммерческий вирусный препарат PVY Y (6) – Virus commercial antigen PVY	31,27	<50	33,86
ОКО Negative control	<50	<50	34,01
ОКО-В Negative control, virus free sample	<50	<50	34,00
ПКО Positive control	30,2	29,95	34,32
Примечание – Ct – пороговый цикл; R6G, FAM, Cy5 – каналы детекции; ВПК – внутренний положительный контроль; ОКО – отрицательный контроль; ПКО – положительный контроль; ОКО-В – отрицательный контрольный образец выделения. Note – Ct – threshold cycle; R6G, FAM, Cy5 – detection channels; IPC – internal positive control.			

Как показано в таблице 6, у всех вариантов обнаружился PVY, наличие X-вируса картофеля не наблюдалось.

Таблица 7. Тестирование сортообразцов картофеля и табака на содержание PVM и PLRV методом ПЦР-РВ

Table 7. Test result of potato and tobacco samples for PVM and PLRV infection in PCR-RT

Образец Sample	Ct R6G PVM	Ct FAM PLRV	Cy5 ВПК
Растение-регенерант <i>Nicotiana tabacum</i> PVY <i>Nicotiana tabacum</i> PVY, regenerated plant	<50	<50	32,67
Каллус <i>Nicotiana tabacum</i> PVY <i>Nicotiana tabacum</i> PVY, Callus	<50	<50	32,45

Сорт картофеля <i>Cherie in vitro</i> Potato <i>in vitro</i> , variety <i>Cherie</i>	<50	<50	32,25
У (3) – коммерческий вирусный препарат PVY У (3) – Virus commercial antigen PVY	<50	<50	32,37
У (6) – коммерческий вирусный препарат PVY У (6) –Virus commercial antigen PVY	<50	<50	32,52
ОКО Negative control	<50	<50	32,63
ОКО-В Negative control, virus free sample	<50	<50	32,27
ПКО Positive control	29,27	28,3	32,84

Таким образом, на основе метода ПЦР-РВ установлено, что PVY, выявленный в пробирочных растениях картофеля сорта *Cherie*, обнаруживается после инокуляции растений *Nicotiana tabacum*, культивируемых в виде каллуса, а также сохраняется у индуцированных из него *in vitro* растениях-регенерантах. Кроме того, подтверждена чистота применяемого для получения поликлональных антител коммерческого вирусного препарата.

Четвертый этап – получение поликлональных антител специфичных к PVY. Для диагностики вирусных заболеваний картофеля в качестве специфичных компонентов иммунологических реакций в настоящее время применяются поликлональные антисыворотки лабораторных животных. Исходя из этого, на данном этапе исследования проводилась иммунизация мышей 3-мя видами вирусных препаратов У-вируса картофеля: слабоочищенного (препарат 1), высокоочищенного (препарат 2) и коммерческого (контроль), с целью получения поликлональных антисывороток к PVY. Иммунизацию проводили по схеме, приведенной в разделе «Объекты и методы исследования».

Как известно, основным показателем эффективности антивирусных диагностических сывороток является титр специфических антител. Тестирование сывороток крови проводили в непрямом иммуноферментном анализе (таблица 8).

Таблица 8. Изучение активности мышиных антисывороток к полученному антигену PVY в непрямом варианте ИФА

Table 8. Testing mouse antisera activity with isolated PVY-antigen in indirect ELISA

Вариант антигена Antigens	Забор крови Blood sampling	Титры иммуноглобулинов Titers of immunoglobulin								
		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	25 600
Коммерческий (контроль) Commercial (control)	На 25-сутки In 25 th day	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	На 59 суток после реиммунизации In 59 th after re-immunization	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Высоко-	На 25-сутки	+	+	+	+	+	+	-	-	-

очищенный препарат Well purified virus antigen	In 25 th day										
	На 59 сутки после реиммунизации In 59 th after re-immunization	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
Слабоочищенный препарат Low purified virus antigen	На 25-сутки In 25 th day	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	На 59 сутки после реиммунизации In 59 th after re-immunization	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

Данные, представленные в таблице 8, показывают, что в проводимом эксперименте полученные иммуноглобулины лучше вступали в реакцию с коммерческим вирусным препаратом. Из исследуемых вирусных антигенов вариант с высокоочищенным препаратом имел титр в ИФА – 1/6400 и превосходил в 2 раза вариант со слабоочищенным препаратом.

ВЫВОДЫ

1. Отработаны оптимальные параметры накопления и очистки вируса картофеля PVY в культуре изолированных органов и тканей растений *Nicotiana tabacum*. Максимальное накопление PVY установлено на 25-е сутки после инокуляции тест-растений. Из листовых эксплантов искусственно зараженных растений *N. tabacum* на агаризованной питательной среде МС с 0,5 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК и 2 мг/л кинетина индуцирован каллус. Интенсивность роста инфицированных каллусных тканей *N. tabacum* на 14-е сутки культивирования составила 107%. Из каллусных культур *N. tabacum* методом ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы получен высокоочищенный препарат Y-вируса картофеля.

2. Методом ПЦР-РВ подтверждена чистота коммерческого вирусного препарата, а также возможность сохранения вируса PVY в пробирочных растениях картофеля сорта *Cherie*, инокулированных растениях *Nicotiana tabacum*, каллусе и индуцированных из него растениях-регенерантах.

3. При иммунизации лабораторных мышей высокоочищенным вирусным препаратом получены поликлональные антитела, специфичные к PVY с титром 1/6400.

Научной новизной настоящей научно-исследовательской работы является изучение особенностей накопления вируса картофеля PVY в каллусных культурах, а также индуцированных из них растениях-регенерантах.

Практическая значимость полученных результатов заключается в альтернативном получении иммуногенного вирусного препарата картофеля PVY, пригодного для круглогодичного получения поликлональных мышинных антител.

Финансирование

Исследования проводились в рамках бюджетной программы 055 «Научная и/или научно-техническая деятельность», подпрограммы 101 «Грантовое финансирование научных исследований» по проекту «Разработка экспресс-теста для диагностики вирусных заболеваний картофеля».

ЛИТЕРАТУРА

1. Агропромышленный комплекс Казахстана. Производство картофеля [Электронный ресурс]. – 2009 // <http://www.agroprom.kz/info/novosti-predpriyatiy/proizvodstvo-kartofelya>. 15.11.2012.
2. Горай О. Казахстан: Как получить хороший урожай картофеля [Электронный ресурс]. – 2011 // <http://www.meta.kz/618354-kazahstan-kak-poluchit-horoshiy-urozhay-kartofelya.html>. 15.11.2012.
3. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – С. 301.
4. Поддержание коллекции фитопатогенных вирусов и их штаммов в культуре тканей растений: методические рекомендации / ВАСХНИЛ. – 1989. – №7. – С. 9-11.
5. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the mikroplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. // J. Gen. Virilology. – 1977. – Vol. 34. – P. 475-483.
6. Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М.: МСХ РФ, 2000. – С. 76.
7. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков и др. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 223.
8. Швидченко В.К., Хасанов В.Т., Фида М.А., Бейсембина Б., Харченко П.Н., Алексеев Я.И. и др. Сравнение методов иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени для диагностики зараженности сортообразцов картофеля вирусами // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. Биотехнология. – 2014. – №2. – С. 47-49.
9. Патент №2068882. Российская Федерация. Штамм Y-вируса картофеля для получения антигена, используемого при производстве иммуноферментного диагностикума / Ю.А. Варицев, Л.И. Егорова, Г.П. Варицева и др. – зарег. 10.11.96, Бюл. №31.
10. Атабеков И.Г., Бобкова А.Ф., Нацвлишвили и др. Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля. – М., 1985. – С. 19.
11. Практикум по общей вирусологии: учеб. пособие / под ред И.Г. Атабекова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Изд-во МГУ, 2002. – С. 184.
12. Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля / под ред. Г. Лебенштейна, Ф.Х. Бергера, А.А. Бранта, Р.Х. Лоусона. – М., 2005. – С. 156-172.
13. Фримель Х. Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – С. 89-97.

REFERENCES

1. Agro-industrial complex of Kazakhstan. Potato production (2009) // <http://www.agroprom.kz/info/novosti-predpriyatiy/proizvodstvo-kartofelya> (date accessed: 15.11.2012).
2. Guray O. How to get a good crop of potato? // <http://www.meta.kz/618354-kazahstan-kak-poluchit-horoshiy-urozhay-kartofelya> (date accessed: 15.11.2012).
3. Gnutova R.V. Serologiya i immunokhimiya virusov rasteniy [Serology and immunochemistry of plant viruses]. Moscow, Nauka, 1993, 301 p.

4. Podderzhanie kollektzii fitopatogennykh virusov i ikh shtammov v kulture tkanei rasteniyn [Maintaining collection of pathogenic viruses and their strains in tissue culture]. Методические рекомендации ВАСХНИЛ - Guidelines VASKHNIL, 1989, vol. 7, pp. 9-11.

5. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the mikroplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Viriology*, 1977, vol. 34, pp. 475-483.

6. Simakov E.A., Uskov A.I. and Varitsev Y.A. Novye tekhnologii proizvodstva iskhodnogo ozdorovlennogo materiala v elitnom semenovodstve kartofelya [New technologies for production of virus-free source material in potato's seed production], recommendation. Moscow, MSKH RF, 2000, pp. 76.

7. Rebrikov D.V. [PCR in Real-time. BINOM. Knowledge Laboratory]. Moscow, 2011, 223 p.

8. Shvidchenko V.K., Hassanov V.T., Fida M.A., Beisembina B., Kharchenko P.N., Alekseev Ya. I. et al. Sravnenie metodov immunofermentnogo analiza i PCR v realnom vremeni dlya diagnostiki zarazhonnosti sortoobraztsov kartofelya virusami [Comparison of ELISA and PCR real-time for diagnosis of potato viral infection]. Journal. Vestnik Rossiyskoy akademii selskokhozyaystvennykh nauk J. Russian Academy of Agricultural Sciences, 2014, vol. 2, pp. 47-49.

9. Varitsev Y.A., Egorova L.I., Varitseva G.P. (1996). Shtamm Y-virusa kartofelya dlya polucheniya antigena, ispolzuemogo pri proizvodstve immunofermentnogo diagnostikuma [Strain of potato virus Y-for antigen production ELISA diagnostic]. Patent of the Russian Federation. J.Inventions №31.

10. Atabekov I.G., Bobkov A.F. Metodicheskie rekomendatsii po primeneniyu immunofermentnogo analiza dlya diagnostiki virusov kartofelya [Guidelines on the application of an enzyme immunoassay for the diagnosis of potato viruses]. Moscow, 1985, 19 p.

11. Atabekova I.G. Praktikum po obschei virusologii [Practicum on General Virology]. Moscow, publisher, MGU, 2002, 184 p.

12. Lebenshteyna G., Berger F.H., Brant A.A. and Lawson B.C. Virusnie i virusopodobnie bolezni i semenovodstvo kartofelya [Viral and virus-like diseases and potato's seed production]. St. Petersburg ed. G.S., 2005, pp. 156-172.

13. Friemel J. Immunologicheskie metodi [Immunological Methods]. Moscow, medicine, 1987, pp. 89-97.

ТҮЙІН

Оларды бөліп шығару әдістемесін оңтайландыру мақсатында картоптың вирустарын жинақтау және тазарту технологиясына балама тәсілдер іздестіру өте өзекті болып табылады. Бір мезгілде онда вирусты жинақтай отырып, өсімдіктердің каллустық тінін алу және өсіріп жетілдіру материалды басқа вирус жұқтыруды болдырмайтын, *in vitro* жағдайында ұзақ сақтауға мүмкіндік береді. Бұдан басқа, каллустық тіннен вирустық антигендерді бөліп шығару көптеген ерекше нәруыздардың болмауы нәтижесінде жоғары деңгейде тазартылған препараттар алуға, сондай-ақ жыл уақытына қарамастан антигеннің жеткілікті мөлшеріне ие болуға мүмкіндік береді.

Біздің зерттеулеріміздің мақсаты вирустық антигенді одан әрі бөліп шығару және тазарту, ерекше антиденелер алу үшін өсімдік тіндерінде картоптың Y-вирусын жинақтау болып табылды. Тиісінше картоптың Y-вирусы зерттеулер объекті қызметін атқарды. Картоптың Y-вирусын жинақтаушы ретінде Samsun сортының *Nicotiana tabacum* өсімдіктері пайдаланылды.

Мақалада *Nicotiana tabacum* каллустық дақылдарынан PVY картобының вирустық антигенін алудың нәтижелері келтірілген. Алдын ала PVY жұқтырған *Nicotiana tabacum*

өсімдігінен алынған каллустық материалдың PVY вирусын өзінде жинақтауға және ұзақ сақтауға қабілетті екендігі анықталды. ИФА және НУ-ПТР әдісімен коммерциялық вирустық препараттың тазалығы, сондай-ақ PVY-ні қартоптың Cherie сортының түтіктегі өсімдіктерінде, *Nicotiana tabacum* жұқтырылған өсімдіктерінде, каллуста және одан жұқтырған регенерант-өсімдіктерде сақтау мүмкіндігі расталды. Тәжірибенің қорытынды кезеңінде 1/6400 – титрлі ИФА антигенімен реакцияға түскен, PVY-ге ерекше сұрғылт поликлональды антиденелер алынды.

Кілтті сөздер: картоптың Y-вирусы (PVY), *Nicotiana tabacum*, антиденелер, антиген, каллус, иммуноферменттік анализ (ИФА), нақты уақыттағы полимераздық тізбекті реакция (НУ-ПТР), антиденелер титрі.