

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) = Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2020. - №2 (105). - С.39-51

ИЗУЧЕНИЕ КАЗАХСТАНСКИХ И РОССИЙСКИХ ИЗОЛЯТОВ S-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ: МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОЛОГИЧЕСКИЕ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

*В.Т. Хасанов*¹, к.б.н., и.о. профессора

*Ю.А. Варицев*², к.б.н.

*А.И. Усков*², д.б.н.

*А.М. Таскулова*¹, магистр,

*А. Амиргазин*³, бакалавр

¹ «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», пр. Жеңіс, 62, Нур-Султан, 010011, Республика Казахстан, agun.katu@gmail.com.

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха», ул. Лорха, д. 23, литер В, Московская область, пос. Красково, Люберецкого района, 140051, Россия, mail@vniikh.com

³ Республиканское государственное предприятие «Национальный центр биотехнологии» Комитета науки Республики Казахстан, Кургальжинское шоссе, здание 13/5, г. Нур-Султан, 010000, Республика Казахстан, info@biocenter.kz

Аннотация

При мониторинге зараженности картофеля возбудителями вирусных заболеваний методом иммуноферментного анализа (ИФА) в посадках Северного и Южного Казахстана отобраны растительные образцы с моноинфекцией вирусов переведенных *in vitro* на основе которых создана коллекция казахстанских изолятов X-, S-, M-, Y-, L- вирусов картофеля. Приведены результаты изучения электронно-микроскопических, биологических, иммунохимических и молекулярно-генетических свойств казахстанских изолятов S-вируса картофеля (SBK) в сравнении с российскими изолятами, поддерживаемыми в коллекции ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. С помощью методов растений-индикаторов и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) изучена принадлежность исследуемых изолятов к андийской и ординарной группам штаммов SBK. На основе высокоочищенного препарата изолята SBK-Престиж разработаны тест-системы ИФА с чувствительностью порядка 16 нг/мл.

Ключевые слова: S-вирус картофеля, изоляты, штаммы, электронная микроскопия, растения-индикаторы, растения картофеля *in vitro*, инокуляция, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ.

Введение

Картофель (*Solanum tuberosum*) является одним из основных продуктов питания на евразийском континенте. В Казахстане картофель является второй по важности сельскохозяйственной культурой после пшеницы. Урожайность картофеля в Казахстане составляет примерно четверть от урожайности этой культуры в западно-европейских странах. Одной из причин такого положения является использование семенного материала, пораженного в высокой степени возбудителями вирусных, бактериальных и грибных болезней.

Одним из наиболее распространенных и вредоносных возбудителей вирусозов картофеля в республике Казахстан является S-вирус картофеля, в моноинфекции вызывающий снижение урожайности на 10-20%, а в коинфекции с другими вирусами, например Y-вирусом картофеля - многократное усиление их вредоносности [1].

SBK относится к семейству *Betaflexiviridae*, роду *Carlavirus*. Вирионы SBK – нитевидные частицы, длиной 650 – 710 нм, 12 нм в диаметре [2]. Температура инактивации в соке колеблется от 55 – 60°C. При комнатной температуре инфекционность сока теряется через 2–6 дней. Предельное разведение сока 10^{-4} [3]. Известны два основных штамма вируса – обычный (ordinary) SBK^O и андийский (andean) SBK^A, а также несколько второстепенных. Штамм SBK^O имеет широкое распространение в мире, а о

распространение штамма SBK^A существует мнение, что он распространен исключительно в странах Южной Америки [4].

Симптомы, которые вызывает SBK^O, обычно незаметны на растениях. Большинство сортов картофеля заражается этим вирусом без каких-либо внешних симптомов проявления заболевания. Иногда наблюдается более светлая окраска, и даже мозаичность, слабая морщинистость, меньшая облиственность и т.д. На старых листьях виден бронзовый оттенок. У некоторых сортов картофеля вирус вызывает некротизацию верхушек стеблей и опадение бутонов, может наблюдаться крапчатость, некротические поражения листьев [6]. Этот штамм вызывает исключительно локальные повреждения на зараженных листьях лебеды *Chenopodium quinoa Willd.*, а штамм SBK^A при механической инокуляции *Chenopodium quinoa* индуцирует как локальные, так и системные симптомы [7, 8].

Исследуя нуклеотидные последовательности изолятов SBK Matous et al. [9] сообщил о новом штамме SBK под названием SBK^{CS} (*Chenopodium systemic*), который вызвал системные симптомы на *C. quinoa*, но обладал сходной с SBK^O аминокислотной последовательностью вирус-кодируемого белка оболочки [10].

Целью настоящих исследований являлось сравнительное изучение морфологических, биологических, молекулярно-генетических и

иммунохимических свойств казахстанских и российских изолятов SBK. Основная работа проводилась в лаборатории биотехнологии растений кафедры «Защита и карантин растений» НАО «КАТУ им. С. Сейфуллина». В отделе биотехнологии и иммунодиагностики ВНИИКХ им. А.Г. Лорха проводились работы по

Материалы и методика исследований

Объекты исследований являлись казахстанские и российские изоляты S-вируса картофеля. Казахстанские изоляты SBK отбирали в Северном и Южном Казахстане в виде клубневых клонов растений картофеля, предварительно тестированных на наличие SBK и отсутствие примесной инфекции X-, M-, Y-, A-, L-вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа с последующим введением их в стерильную культуру *in vitro*. Российские изоляты SBK были получены в виде растений картофеля *in vitro* и очищенных препаратов из коллекции отдела биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха.

Моноизоляты SBK поддерживали в виде клубневых клонов, и выращенные из них в изолированных условиях растения использовали для исследования методами электронной микроскопии, растений-индикаторов, полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа. Очищенный препарат SBK-Престиж был использован для получения кроличьей антисыворотки к SBK, на основе

очистке SBK из листьев растений-накопителей и приготовлению иммуноспецифических частей диагностических тест-систем для иммуноферментного анализа, исследования с использованием метода ОТ-ПЦР проводили на базе Республиканского Государственного Предприятия «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК.

которой были приготовлены специфические части диагностической тест-системы ИФА.

Метод растений-индикаторов. В качестве растений-индикаторов использовали растения *Chenopodium quinoa*, которые выращивали из семян на биогумусе «Живая земля» с почвогрунтом в соотношении 1:1. Выращивание растений проводилось при постоянном освещении с интенсивностью 1500 лк, при температуре 24-25°C.

Работы по введению изолятов SBK в культуру *in vitro* и их поддержанию в коллекции проводились в соответствии со стандартной методикой [11, 12].

Инокуляцию исследуемых тест-растений SBK осуществляли с помощью механического заражения инфекционным соком растений картофеля, поддерживаемых в культуре *in vitro*, листьев растений *Chenopodium quinoa* в фазу 3-5 листьев. Инфекционный сок получали гомогенизацией листьев инфицированных растений картофеля в 0,01M фосфатном буфере. При инокуляции растений-индикаторов очищенными

вирусными препаратами последние разводили в 0,1М калий-фосфатном рН 7,2 буфере до концентрации 20 мкг/мл.

Иммуноферментный анализ. При проведении ИФА применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля производства ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха. Для иммунологической проверки растений на вирусносительство применялся метод двойного наложения антител («сэндвич» - вариант ИФА) по стандартной методике [11]. Наличие вируса в

исследуемых образцах регистрировали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света ASYS Expert 96 (Австрия) при длине волны 492 нм.

ОТ-ПЦР. Идентификацию штаммовой принадлежности S-вируса картофеля проводили с применением праймеров, заказанных в компании Lumiprobe (г. Москва).

Изоляты SBK тестировали на принадлежность к андийскому (SBK^A), и обычному (SBK^O) штаммам методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров PVS-A7228s/ PVS-A7986a и PVS-O7577s/ PVS-O8065a (таблица 1).

Таблица 1 – Праймеры, используемые для детекции штаммов SBK [12]

Патоген/штамм	Название праймера	Последовательность, 5'– 3' Sequence, 5'– 3'	Кол-во ампликонов	Размеры
PVS ^A (CP)	PVS-A7228s	AGATCCTTCTAGTTCAGGG GAAG	23	759
	PVS-A7986a	GCCATGCTCTTGTGAGCGT TA	21	
PVS ^O (CP)	PVS-O7577s	GCTGACATCGCTGGACTTG GG	21	489
	PVS-O8065a	ATCTCAGCGCCAAGCATC CCT	21	

Использовали протоколы ОТ-ПЦР, описанные в работе [12]. Зараженные SBK сортообразцы растений картофеля *in vitro* были также исследованы методом классической ОТ-ПЦР на наличие X-, S-, Y- и M- вирусов картофеля по стандартной методике [13].

Электронная микроскопия. Образцы исследованы на растровом электронном микроскопе TESCAN MIRA3 FEG SEM. Управление микроскопом полностью

автоматизировано и осуществляется с помощью программного обеспечения SEM TESCAN. Образцы наносили из растворов на полированную поверхность алюминиевой фольги, высушивали на воздухе в течение нескольких часов.

Поскольку были образцы непроводящими, то для снятия избыточного электронного заряда, а также для улучшения контрастирования и избегания

разрушения объектов исследования под воздействием электронного пучка, на образцы наносили золотое покрытие толщиной в несколько нанометров. Покрытие наносили с применением системы подготовки образцов Q 150R ES. Исследования проводились в режиме высокого вакуума, при невысоких ускоряющих напряжениях (4-7 эВ), изображения получали с применением детектора вторичных электронов (SE-детектора) [14, 15].

Получение антисыворотки к SBK. Вирус накапливали на растениях томата сорта Невский. Растения в фазе 3-4 листьев механически заражали соком листьев инфицированных растений картофеля изолятом SBK-Престиж, поддерживаемых в культуре *in vitro*. Через 4 недели выращивания в теплице растения проверяли методом ИФА на присутствие X, M, Y, L, A-вирусов картофеля и ВТМ. При наличии положительной реакции на SBK и отсутствии на всех проверяемых растениях возможных примесей X, M, Y, L, A-вирусов и ВТМ, листья томатов использовали для очистки вируса.

Для этого 400 г инфицированных листьев гомогенизировали в блендере Warring при 18 тыс. об/мин. с 800 мл 0,1 М К-фосфатного буфера pH 7,0, содержащего 0,01 М трилона Б и 0,1% 2-меркаптоэталола в течение 2 мин. Гомогенат фильтровали через 2 слоя марли и полученный сок осветляли добавлением н-бутанола (до 8,5 %), перемешивая смесь в течение 30 мин. на ледяной бане. После центрифугирования в течение

10 мин. при 8000 об./мин. осадок отбрасывали, а к супернатанту добавляли Тритон X-100 до 0,5 % и перемешивали на ледяной бане в течение 30 мин. Затем вирус осаждали добавлением ПЭГ-6000 до 5% и NaCl до 0,3 М. После 90 мин. слабого перемешивания при 40 осадок отделяли центрифугированием при 12000 об./мин. в роторе JA-14 центрифуги J2-21 (Beckman, США). Далее из осадка экстрагировали вирус, трижды суспендируя его в 30 мл 0,1 М глицинового буфера pH 7.5 и центрифугируя 15 мин. при 10000 об/мин. Полученный экстракт наносили на 7-ми мл слой 20% раствора сахарозы (w/w) на глициновом буфере в пробирке ротора SW 28 и центрифугировали в течение 2,5 часов при 27000 об./мин. Из полученного осадка трижды экстрагировали вирус по 1,5 мл того же глицинового буфера, осветляя экстракт центрифугированием 10000 об./мин. в течение 10 мин. По 0,75 мл экстракта наслаивали на диффузионный градиент сахарозы 10-40% (w/w), приготовленный в пробирках от ротора SW 41 ультрацентрифуги Beckman L7-55 и центрифугировали 120 мин. при 32000 об./мин. Далее градиент раскапывали с помощью перистальтического насоса и коллектора фракции на 15-16 фракций объемом примерно по 700 мкл, измеряли на спектрофотометре СФ-26 экстинцию при длине волны 280 нм и определяли наличие вируса во фракциях градиента с помощью ИФА. Вирус содержащие фракции объединяли, разбавляли в 4 раза и

осаждали вирус центрифугированием при 45000 об./мин. в роторе 50 Ti в течение 120 мин. Из полученного осадка экстрагировали вирус 2 мл глицинового буфера, осветляли центрифугированием 15 мин. при 10000 об./мин.

Препараты характеризовались спектрофотометрически: по соотношению A_{260}/A_{280} , которое составило 1,19, что характерно для высокоочищенных препаратов этого вируса. Концентрацию вируса определяли, используя коэффициент $A_{260} = 1,77$, соответствующий концентрации вируса 1 мг/мл. Также препараты проверялись на наличие примесей вирусов с помощью ИФА. Выход очищенного вируса составлял 15-20 мг. К полученному препарату добавляли глицерин до 50 % и хранили при -18°C .

Иммунизация лабораторных животных. Иммунизацию кроликов SBK проводили по следующей схеме: 0-й день – подкожно 1 мл антигена (50 мкг вируса) с полным адьювантом Фрейнда в 5-6 точек вдоль позвоночника; 21-й день – подкожно 1 мл антигена (50 мкг вируса) с полным адьювантом Фрейнда в 5-6 точек вдоль позвоночника; 35-й день – подкожно 1 мл антигена (50 мкг вируса) с полным адьювантом Фрейнда в 5-6 точек вдоль позвоночника. На 7-12-е сутки после последней инъекции – отбор крови.

Нативные антисыворотки, полученные иммунизацией кроликов очищенным препаратом SBK-Престиж разводили в 3 раза 0,01 М фосфатно-солевым буфером pH 7,2

(PBS) и наносили на активированную и уравновешенную этим буфером колонку, заполненную аффинным сорбентом «белок G-сефарозой» в соотношении 5 мл сорбента на 10 мл нативной сыворотки и отмывали сорбент от несорбированных белков PBS до получения значения A_{280} меньше 0,05. Иммуноглобулины элюировали с колонки 0,1 М глициновым буфером pH 2,5, доводили до нейтральных значений с помощью 0,3 М трис-HCl буфера pH 9,0, преципитировали добавлением равного объема насыщенного раствора сульфата аммония и осаждали центрифугированием 15 минут при 10000 об/мин. Концентрацию специфических антител определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм и чистоту глобулиновой фракции по соотношению A_{280}/A_{252} . Далее часть иммуноглобулинов, используемых как покровные антитела, консервировали в 50% глицерине и хранили при -18°C , а другую часть конъюгировали с высокоочищенной пероксидазой хрена методом периодатного окисления [16], консервировали в 50% глицерине и также хранили при -18°C .

Изучение оптимального (рабочего) разведения полученных конъюгатов и антител. Специфические части использовались в трех вариантах, названных нами тест-система-1, тест-система-2 и тест-система-3, для которых использовались разные разведения конъюгатов и антител к вирусному препарату. При этом

применяли среднесорбционные планшеты фирмы «ALTO» (Италия) (тест-система-1), Медполимер

Результаты и их обсуждение

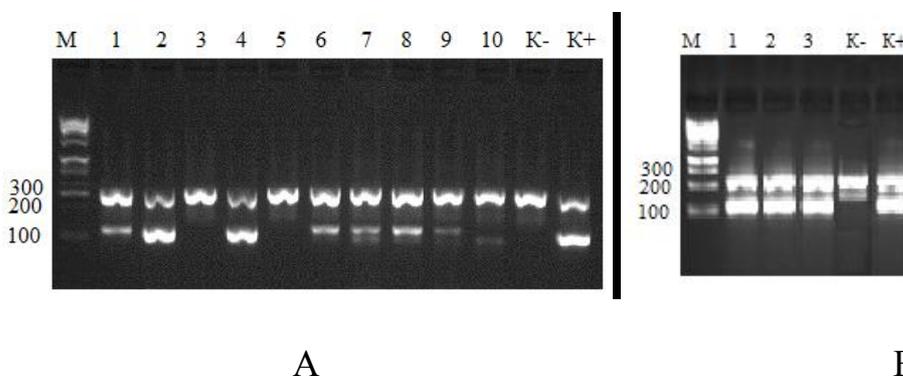
На первом этапе исследований с помощью диагностических наборов ИФА производства ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха (Россия) проводили мониторинг посадок картофеля Северного и Южного Казахстана на наличие шести основных вирусов картофеля с целью поиска местных моноизолятов этих вирусов.

В результате этой работы из отобранных образцов картофеля в Южно-Казахстанской и Костанайской области были выделены изоляты SBK-Ароза, SBK-Акжол №25; SBK-Такома №11; SBK-Пароли №1, SBK-Тамыз №19; SBK-

(Россия) (тест-система-2) и Rollmed CO LTD (Китай) (тест-система-3).

Шагалалы №1; SBK-Коктем №21; SBK-Лина Костаная №69; SBK-Алая заря №20; SBK-Такома №5; SBK-Тустеп № 68; Из них выявлено 3 моноинфицированных клона SBK-Ароза №2, SBK-Ароза №8 и SBK-Тустеп №68. Вирусные препараты SBK-Престиж SBK-Ароза SBK-62 также подтвердили свою чистоту.

Для подтверждения инфицированности образцов картофеля SBK, ранее установленной методом ИФА, последние оценивали методом ОТ-ПЦР наборами «Агродиагностика» (рисунок 1).



А: 1 – изолят SBK-Акжол №25; 2 – Такома №11; 3 – изолят SBK-Пароли; 4 - SBK-Тамыз №19; 5 – изолят SBK-Шагалалы №1; 6 – SBK-Коктем №21; 7- изолят SBK-Лина Костаная №69; 8 – изолят SBK-Алая Заря; 9 – изолят SBK-Такома №5; 10 – изолят SBK-Тустеп+ №68; «К+» - положительный контроль; «К-» - отрицательный контроль.

Б: 1 - препарат SBK-62, 2 – препарат SBK-Ароза; 3 - препарат SBK-Престиж.

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ продуктов амплификации праймеров для тестирования Казахстанских образцов картофеля (А) и Российских вирусных препаратов (В) на SBK в 1,5% агарозном геле, М – маркер (GeneRuler 1 kb DNA Ladder)

В результате тестирования образцов методом ОТ-ПЦР российские изоляты SBK-Престиж, SBK-62, SBK-Ароза, казахстанские изоляты SBK-Акжол №25, SBK-Пароли №1, SBK-Тустеп №68 и SBK-Ароза №3 показали наличие продукта амплификации праймеров размером 278 п.н., что подтверждает результаты ИФА. Появление праймер-димеров в описанных условиях является следствием повышенной концентрации праймеров и увеличенном количестве циклов, особенно в мультиплексной реакции.

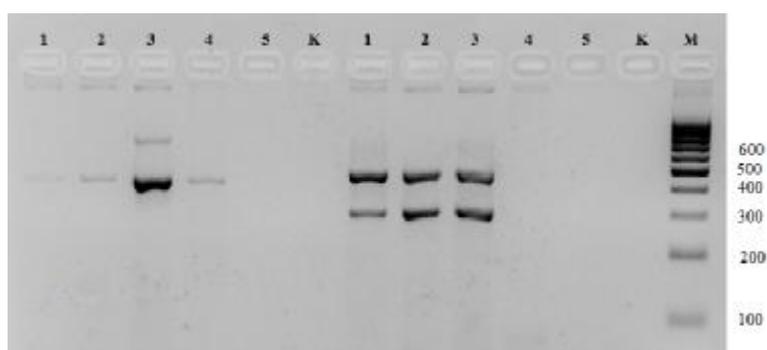
РНК из растений выделялось по методу сорбции на силикагель. Данный метод выделения может фрагментировать целевые молекулы РНК. По окончании реакции обратной транскрипции получают также фрагментированные целевые кДНК. Поэтому, при их амплификации могут возникать продукты неспецифической длины.

В дальнейшем отобранные моноизоляты PVS изучали на

штаммовую принадлежность методом ОТ-ПЦР. Для этого после проведения полимеразной цепной реакции анализировали электрофоретические разделенные продукты ПЦР, полученных с помощью штаммоспецифических праймеров в ОТ-ПЦР как описано Wang с соавторами [12].

Результаты разделения ПЦР-продуктов исследуемых изолятов SBK представлены на рисунке 2.

В соответствии с электрофореграммой, представленной на рисунке 2, российские изоляты (образцы №1-3) содержали смесь штаммов ($PVS^A + PVS^O$). Изолят PVS-Ароза (KZ) (образец №4) показал положительную реакцию на штамм PVS^A . Амплификация кДНК с вышеназванными праймерами изолята SBK-Тустеп не выявила продуктов, характерных как для штамма SBK^A так и для штамма SBK^O S-вируса картофеля.



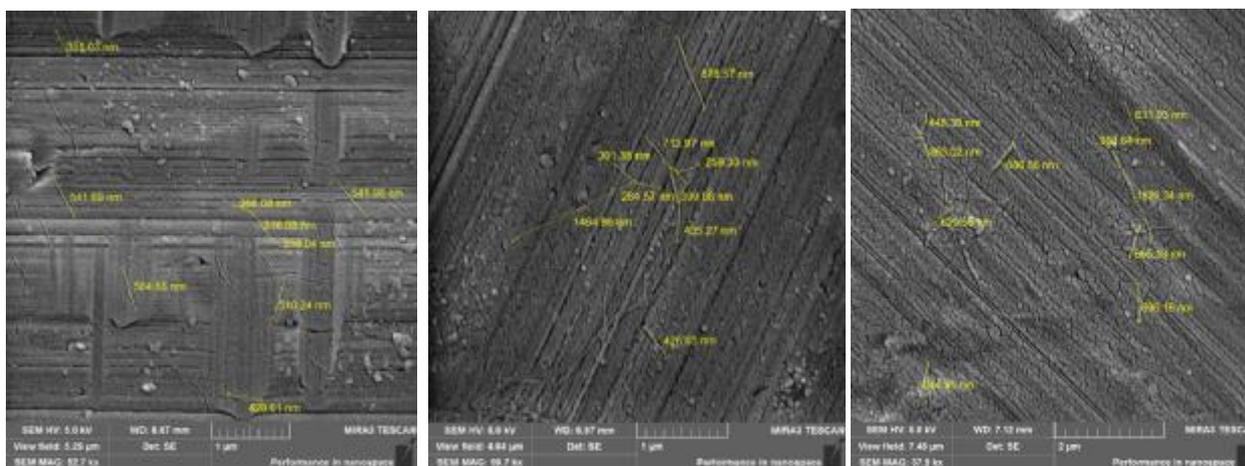
А – идентификация штаммов SBK с помощью праймеров PVS-A7228s/PVS-A7986a
 Б – идентификация штаммов SBK с помощью праймеров PVS-O7577s/PVS-O8065a

1 – изолят SBK – Ароза (РФ); 2 – изолят SBK (РФ) – 62; 3 – изолят SBK-Престиж (РФ)
 4 – изолят SBK-Ароза (РК); 5 – здоровое растений Тустеп (РК); М – маркер

(GeneRuler 1 kb DNA Ladder)

Рисунок 2 – Идентификация штаммов S-вируса картофеля в ОТ-ПЦР по Wang et al. [12]

На рисунке 3 представлены результаты изучения изолятов S-вируса картофеля методом электронной микроскопии.



А

Б

В

А – препарат Ароза (РФ); Б – препарат SBK–Престиж (РФ);
В – препарат SBK-62(РФ)

Рисунок 3 – Электронные микрофотографии изолятов SBK (x 50 000)

Электронно-микроскопическое исследование высокоочищенных препаратов российских изолятов S-вируса картофеля, показало наличие нитевидных вирионов с модальной длиной в препарате изолята SBK-Ароза (РФ) – 479,17 нм, в препарате SBK-Престиж – 573,66 нм и в препарате SBK-62 – 748,56 нм, что несколько отличалось от литературных данных, согласно которым длина вириона S-вируса картофеля составляет 650-710 нм [5].

Попытки наблюдать различные вирионы из листовых образцов картофеля,

инфицированных казахстанскими изолятами S-вируса оказались безуспешными.

Как известно, идентификация штаммовой принадлежности вируса не обходится без метода растений-индикаторов. Для выявления штаммов SBK использовали растения *Chenopodium quinoa*. Известно, что SBK имеет две группы штаммов: SBK^O и SBK^A, которые вызывают на зараженных ими растениях различные симптомы (рисунок 4).



1



2



3



4



5

1 – изолят SBK-Престиж; 2 – изолят SBK-Тустеп; 3 – изолят SBK-Ароза препарат (РФ), 4 - изолят SBK Ароза №3 (РК); 5 – лист неинокулированного растения *Chenopodium quinoa* (контроль)

Рисунок 4 - *Chenopodium quinoa* на 7-е сутки после заражения

При инокуляции *Chenopodium quinoa* изолятом SBK-Престиж растения показывали как системные, так и локальные симптомы, что соответствует андийскому штамму SBK^A, растение *Chenopodium quinoa* инокулированное изолятом SBK-Тустеп показывало системные симптомы, что соответствовало андийскому штамму SBK^A.

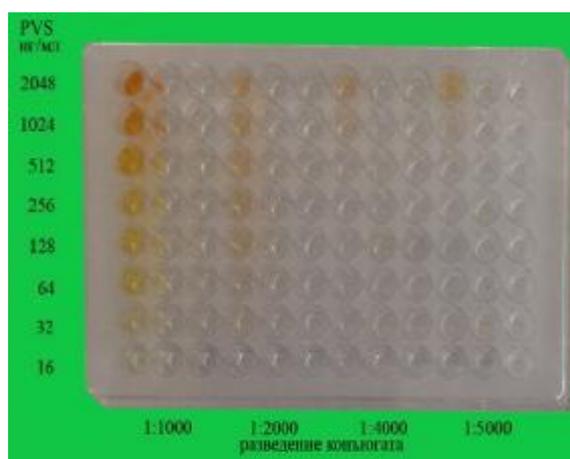
С целью получения поликлональных антител, специфичных к S-вирусу картофеля и получения поливалентной диагностической тест-системы, позволяющей улавливать оба распространенных штамма SBK, для иммунизации кроликов был выбран

высокоочищенный препарат SBK-Престиж. Титры антисыворотки к SBK-Престиж, а также к изолятам других вирусов картофеля определяли в непрямом варианте ИФА (I-ELISA). Полученные данные свидетельствуют, что кроличья антисыворотка к SBK характеризовалась относительно высоким специфическим титром, реагируя с антигеном в рабочем разведении: 1:51200. Неспецифический и гетерологичные титры антисыворотки с вирусными антигенами (сок листьев здорового растения картофеля, очищенный вирусный препарат PVM-Шагалалы (РК), очищенный вирусный

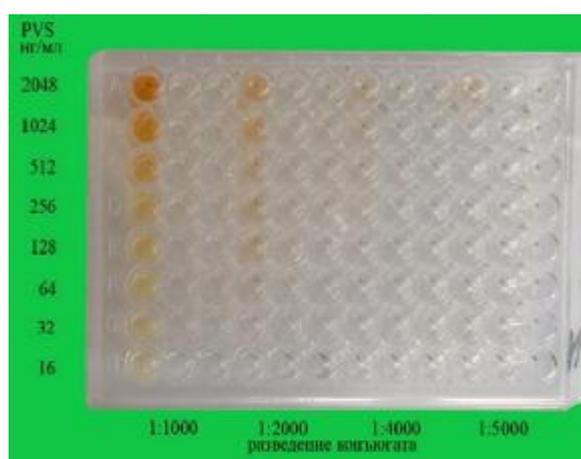
препарат PVY-Cherie (РК), очищенный вирусный препарат PVX-17 (РФ), сок листьев *Datura stramonium*, инфицированного PLRV-Арт-9 (РК), сок *N. tabacum*, инфицированного PVA) не превышали 1:100 – 1:200, что доказывает её высокую специфичность и возможность (таблица 1).

использования для приготовления иммунодиагностических частей тест-систем ИФА.

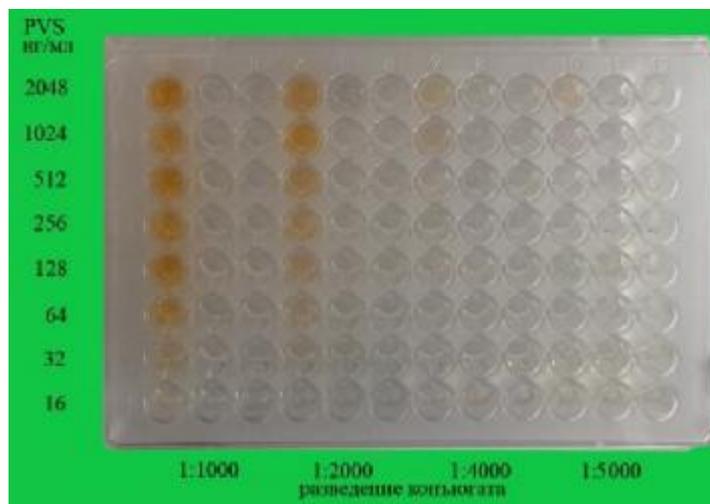
На заключительном этапе исследований устанавливали оптимальное разведение полученных к SBK-Престиж конъюгатов и антител (рисунок 5,



А



Б



В

- А - планшеты среднесорбционные «ЛОТТО» (тест-система-1);
 Б - планшеты среднесорбционные «Медполимер», Россия; (тест-система-2);
 В - планшеты «Rollmed CO LTD», Китай (тест-система-3)

Рисунок 5 – Подбор оптимального разведения пероксидазного конъюгата (ConHRP) к SBK-Престиж

Подбор оптимального разведения пероксидазного конъюгата (ConHRP) к SBK-Престиж проводили на трех видах среднесорбционных полистирольных планшет: «ЛОТТО», Италия (тест-система-1); «Медполимер», Россия; (тест-система-2); «Rollmed CO LTD», Китай (тест-система-3).

Постановка ИФА проводилась в трех повторностях согласно инструкции по применению иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийского НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха [17]. Считывание проводили с помощью спектрофотометра при длине волны 492 нм с остановкой

реакции стоп-реагентом (серной кислотой). Результаты оценивали с помощью фотометра.

Порог достоверности результатов (P) рассчитывали по следующей формуле:

$P=3X$, где X – значение A_{492} для отрицательных контролей [18].

Оптическая плотность образцов в ИФА представлена в таблице 1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оптимальным разведением конъюгатов с добавлением стоп-реагента для всех изучаемых тест-систем является разведение 1:2000. Оптимальное разведение антител – 10 мкг/мл. Чувствительность тест-систем независимо от типа планшет составила 16 нг/мл.

Таблица 2 - Средние значения оптической плотности для выявления чувствительности конъюгатов исследуемых тест-систем

Концентрация антигена, нг/мл	Экстинция в ИФА на различных тест-системах, о.е. при различных разведениях конъюгата											
	1:1000			1:2000			1:4000			1:5000		
	Планшеты среднесорбционные «ЛОТТО», Италия (тест-система-1)											
	PV S	PV S	Ne g	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg
16	2,871	0,14	0,057	1,831	0,149	0,062	0,565	0,059	0,034	0,432	0,062	0,046
32	2,346	0,05	0,044	1,100	0,108	0,042	0,408	0,046	0,048	0,289	0,040	0,054
64	1,158	0,04	0,051	0,895	0,080	0,050	0,333	0,038	0,055	0,1159	0,059	0,058
128	0,991	0,06	0,064	0,711	0,049	0,077	0,120	0,045	0,049	0,084	0,053	0,035
256	0,764	0,060	0,066	0,569	0,062	0,074	0,108	0,055	0,048	0,059	0,051	0,041
512	0,585	0,047	0,053	0,501	0,077	0,063	0,073	0,060	0,039	0,0918	0,048	0,044
1024	0,43		0,0	0,40	0,04	0,04	0,055	0,044	0,05	0,069	0,04	0,04

	3	0,067	54	7	3	9			0		3	8
2048	0,281	0,05	0,060	0,204	0,061	0,058	0,061	0,054	0,061	0,057	0,063	0,060
	P>0,168	Ao/O _{κ=3}	X=0,056	P>0,177	Ao/O _{κ=3}	X=0,059	P>0,144	Ao/O _{κ=3}	X=0,048	P>0,150	Ao/O _{κ=3}	X=0,050
Планшеты среднесорбционные «Медполимер», Россия; (тест-система-2)												
	PV S	PV S	Ne g	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg
16	3,437	0,140	0,054	1,220	0,166	0,058	0,491	0,048	0,054	0,432	0,060	0,058
32	2,955	0,085	0,051	0,986	0,129	0,061	0,408	0,052	0,064	0,190	0,051	0,044
64	2,008	0,056	0,060	0,811	0,090	0,063	0,300	0,039	0,052	0,105	0,049	0,059
128	1,416	0,042	0,065	0,754	0,068	0,060	0,164	0,045	0,067	0,084	0,055	0,051
256	0,908	0,050	0,075	0,592	0,057	0,059	0,087	0,053	0,053	0,064	0,040	0,046
512	0,751	0,061	0,060	0,444	0,079	0,052	0,057	0,051	0,065	0,073	0,044	0,050
1024	0,432	0,047	0,055	0,340	0,059	0,058	0,065	0,055	0,059	0,051	0,061	0,047
2048	0,233	0,050	0,059	0,201	0,065	0,056	0,059	0,058	0,049	0,077	0,048	0,056
	P>0,180	Ao/O _{κ=3}	X=0,060	P>0,174	Ao/O _{κ=3}	X=0,058	P>0,174	Ao/O _{κ=3}	X=0,058	P>0,156	Ao/O _{κ=3}	X=0,052
Планшеты среднесорбционные «Rollmed CO LTD», Китай (тест-система-3)												
	PV S	PV S	Ne g	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg	PV S	PV S	Neg
16	1,898	0,120	0,045	1,112	0,108	0,045	0,388	0,041	0,044	0,204	0,060	0,049
32	1,301	0,098	0,042	0,861	0,113	0,050	0,215	0,059	0,059	0,145	0,053	0,053
64	0,887	0,066	0,036	0,718	0,094	0,056	0,138	0,044	0,041	0,088	0,050	0,040
128	0,622	0,084	0,050	0,593	0,058	0,036	0,125	0,040	0,037	0,104	0,045	0,061
256	0,534	0,060	0,052	0,426	0,087	0,046	0,099	0,038	0,045	0,067	0,052	0,055
512	0,42	0,051	0,0	0,30	0,04	0,03	0,057	0,054	0,05	0,084	0,04	0,04

	1		41	8	0	8			4		7	6
1024	0,369	0,057	0,051	0,269	0,051	0,045	0,063	0,050	0,049	0,055	0,061	0,051
2048	0,206	0,060	0,054	0,203	0,045	0,055	0,055	0,048	0,048	0,063	0,058	0,060
	P>0,138	Ao/ Ok=3	X=0,046	P>0,138	Ao/O k=3	X=0,046	P>0,141	Ao/ Ok=3	X=0,047	P>0,156	Ao/ Ok=3	X=0,052

Примечание:

Ao – среднее значение оптической плотности исследуемой пробы (разведение антител);

Ok – среднее значение оптической плотности отрицательного контроля;

Ao/Ok – отношение среднего значения оптической плотности исследуемой пробы к среднему значению оптической плотности отрицательного контроля.

Результаты оценивали, специфических антител, учитывая минимальное оптическое поглощение для исследуемых отрицательных проб более чем в три рабочих титров конъюгатов раза ($Ao/Ok \geq 3$).

Обсуждение полученных данных и заключение

На основе метода иммуноферментного анализа и ОТ-ПЦР выявлены казахстанские и российские изоляты S-вируса картофеля: SBK-Престиж, SBK-62, SBK-Ароза (ВНИИКХ), SBK-Акжол №25, SBK-Пароли №1, SBK-Тустеп № 68 и SBK-Ароза №3.

Методом биплексной ОТ-ПЦР изучена принадлежность исследуемых изолятов к индийскому и ординарному штаммам SBK. Установлено, что российские изоляты SBK-Ароза, SBK-62, SBK-Престиж содержали смесь штаммов ($SBK^A + SBK^O$). Изолят SBK-Ароза (KZ) идентифицирован как штамм SBK^A .

Электронно-микроскопическое исследование высокоочищенных препаратов российских изолятов S-вируса картофеля свидетельствует о наличии нитевидных вирионов с

более широким, по сравнению с известным, диапазоном модальной длины в препаратах: SBK-Ароза – 479,17 нм, SBK-Престиж – 573,66 нм, SBK-62 – 748,56 нм.

При инокуляции растений-индикаторов, *Chenopodium quinoa*, изолятом SBK-Престиж установлены системные и локальные симптомы, присущие обоим штаммам PVS^A и PVS^O . Казахстанский изолят SBK-Тустеп проявлял системные симптомы, что соответствовало индийскому штамму SBK^A .

Проведена иммунизация кроликов высокочищенным вирусным препаратом изолята SBK-Престиж, получены антисыворотки с титром специфических антител 1:51200, сконструированы тест-системы ИФА к SBK с чувствительностью порядка 16 нг/мл.

Благодарности. Выражаем благодарность коллективам лаборатории биотехнологии растений кафедры «Защита и карантин растений» НАО

«Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина» (Жанабековой А.К.), отдела биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха. (Варицовой Г.П., Галушка П.А.) и РГП «Национальный центр биотехнологии» МОН РК (Шевцову А.Б.).

Список литературы

1. Gutiérrez, P.A., Alzate, J.F. & Marín-Montoya, M.A. Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia // *Archives of virology*. – 2013. – VOL. 10. – P. 2205-2208.
2. Гнутова, Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений. – М.: Наука, 1993. – 301 с.
3. Блоцкая Ж. В. Вирусные болезни картофеля. – Минск: Навука і тэхніка, 1993. – 222 с.
4. Брант, А. А. Основные вирусы заражающие культуру картофеля / А. А. Брант // Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля. – СПб.: Инновационный центр защиты растений, 2005. – 53 с.
6. Швидченко В.К., Созинова Л.Ф. Оздоровление, размножение и диагностика в картофелеводстве: научно-популярная литература. – Астана: КазАТУ им. С. Сейфуллина, 2000. – 163 с.
7. Mackenzie D. J., Tremaine J. H., Stace-Smith R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA // *J. of Gen. Virol.* – 1989. – Vol. 70. – P. 1053–1063.
8. Jones R. A. C., Fribourg C. E., Slack S. A. Potato virus and virus-like diseases // In: *Plant Virus Slide Series, Set №2*, Clemson University, South Carolina. – 1981. – P. 59.
9. Matoušek J, Schubert J, Ptaček J, Kozlova P, Deđić P Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. – 2005. – *Acta Virol* 49:195–205 p.
10. Cox B. A., Jones R. A. C. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains // *Arch. Virol.* – 2010. – Vol. 155. – P. 1163–1169.
11. Симаков Е.А., Усков А.И., Варицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля. – М., 2000. – 76 с.
12. Wang J., Meng F., Chen R. et.al. RT-PCR differentiation, Molecular and Pathological Characterization of Andean and Ordinary Strains of Potato virus S in Potatoes in China // *Plant Disease*. – 2016. – Vol. 100. – №8 – P. 1580-1585.
13. Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. – СПб: ВИР РАСХН, 2011. – 54 с.
14. Криштал М.М., Ясников И.С. и др. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ в примерах практического применения. М.: Техносфера, 2009. – 208 с.

15. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ: В 2-х книгах. Книга 2 Пер. с англ./Гоулдстейн Дж и др. М.: Мир, 1984. – 348 с.

16 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.

17. Simakov E. A., Uskov A.I., Varitsev Yu. A. New technologies of production of the original improved material in the elite seed farming of potatoes. // М., 2000. - 76 p.

18. Инструкция по применению иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля, ФГБНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН, Московская обл., Красково-1, 2018, 6 с.

Referenses

1. Gutiérrez P.A., Alzate J.F. & Marín-Montoya M.A. Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia // Archives of virology. – 2013. – VOL. 10. – P. 2205-2208.

2. Gnutova R.V. Serology and immunochemistry of plant viruses. // М.: Science, 1993. - 301 p.

3. Blotskaya Zh. V. Viral diseases of potatoes. // Minsk: Navuka and Techno, 1993. - 222 p.

4. Brunt, A. A. Major viruses infecting potato culture / A. A. Brunt // Viral and virus-like diseases and potato seed production. - SPb.: Innovative Center for Plant Protection, 2005. - 53 p.

6. Shvidchenko V.K., Sozinova L.F. Improvement, reproduction and diagnosis in potato growing: popular science literature. // Astana: KazATU them. S. Seifullin, 2000. - 163 p.

7. Mackenzie D. J., Tremaine J.H., Stace-Smith R. Organization and intervirial homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA // J. of Gen. Virol. – 1989. – Vol. 70. – P. 1053–1063.

8. Jones R. A. C., Fribourg C. E., Slack S. A. Potato virus and virus-like diseases // In: Plant Virus Slide Series, Set №2, Clemson University, South Carolina. – 1981. – P. 59.

9. Matous ˇek J, Schubert J, Pta ˇc ˇek J, Kozlova P, De ˇdic ˇ P Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. – 2005. – Acta Virol 49:195–205 p.

10. Cox B. A., Jones R. A. C. Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains // Arch. Virol. – 2010. –Vol. 155. – P. 1163–1169.

11. Simakov E. A., Uskov A.I., Varitsev Yu. A. New technologies of production of the original improved material in the elite seed farming of potatoes. // М., 2000. - 76 p.

12. Wang J., Meng F., Chen R. et.al. RT-PCR differentiation, Molecular and Pathological Characterization of Andean and Ordinary Strains of Potato virus S in Potatoes in China // Plant Disease. – 2016. – Vol. 100. – №8 – P. 1580-1585.

13. Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu. Saving vegetatively propagated cultures in vitro and cryocollections: methodical instructions / ed. T.A. Gavrilenko. - SPb: VIR RAAS, 2011. - 54 p.

14. Krishtal M.M., Yasnikov I.S. and others. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis in examples of practical application. // М.: Tekhnosfera, 2009. - 208 p.

15. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: In 2 books. Book 2 Trans. from English / Goldstein J and others. // М.: Mir, 1984. - 348 p.

16. Atabekov I.G., Bobkova A.F., Natsvlishvili N.M. and others. Methodological recommendations on the use of enzyme immunoassay for the diagnosis of potato viruses. // М., 1985. - P. 11-12.

17. Simakov E. A., Uskov A.I., Varitsev Yu. A. New technologies of production of the original improved material in the elite seed farming of potatoes. // М., 2000. - 76 p.

18. Instructions for use of the enzyme immunoassay diagnostic kit for determining potato viruses, Federal State Budgetary Institution All-Russian Research Institute of Potato named after A.G. Lorha RAAS, Moscow region, Kraskovo-1, 2018, 6 p.

КАРТОПТЫҢ S-ВИРУСЫНЫҢ ҚАЗАҚСТАНДЫҚ ЖӘНЕ РЕСЕЙЛІК ИЗОЛЯТТАРЫН ЗЕРТТЕУ: МОРФОЛОГИЯЛЫҚ, БИОЛОГИЯЛЫҚ, МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ ИММУНОХИМИЯЛЫҚ ҚАСИЕТТЕРІ

В.Т.Хасанов¹, б.ғ.к., профессор м.а.

Ю.А.Варицев², б.ғ.к.

А.И.Усков², б.ғ.д.

А.М.Таскулова¹, магистр,

А.Амиргазин³, бакалавр

¹ «С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті», Жеңіс даңғ.
62, Нұр-Сұлтан, 010011, Қазақстан Республикасы, agun.katu@gmail.com.

² Федералдық мемлекеттік бюджеттік ғылыми мекеме «А.Г. Лорха атындағы картоп шаруашылығын Бүкіл Ресейлік ғылыми-зерттеу институты», Лорха к-сі, 23 үй, литер В, Мәскеу облысы, Люберецкий ауданы, Красково а., 140051, Ресей, mail@vniikh.com

³ Республикалық мемлекеттік мекеме «Ұлттық биотехнологиялық орталық»
Қазақстан Республикасының ғылым комитеті Қорғалжын шоссесі, 13/5
ғимарат, г. Нұр-Сұлтан, 010000, Қазақстан Республикасы, info@biocenter.kz

Түйін

ИФТ және КТ-ПТР әдісімен картоптың S-вирусының қазақстандық және ресейлік изоляттары анықталды. Биплексті КТ-ПТР әдісімен ресейлік

изоляттарының құрамында штаммдардың қоспасы бар екендігі (KSB^A + KSB^O), қазақстандық KSB-Ароза изолятында KSB^A штаммы екендігі анықталды. Электрондық-микроскопиялық зерттеуде тазалығы жоғары PVS ресейлік изоляттың препаратын вириондары белгілі вириондардың модальды ұзындығынан қысқа болды. Индикатор- өсімдік әдісімен ресейлік изолят KSB-Престиж PVS^A и PVS^O, қазақстандық изолят KSB-Тустеп KSB^A штаммына жатқызылды. KSB-Престиж препаратымен қояндарды иммунизациялау арқылы айрықша титрлы антиденелер 1:51200 алынды және KSB-ның сезгіштігі 16 нг/мл ИФТ тест-жүйесі жасалды.

Кілттік сөздер: картоптың S-вирусы, изоляттар, штаммдар, электрондық микроскопия, индикатор-өсімдік, *in vitro* картоп өсімдігі, инокуляция, полимераздық тізбекті реакция, иммуноферменттік талдау.

STUDY OF KAZAKH AND RUSSIAN ISOLATES OF POTATO VIRUS S: MORPHOLOGICAL, BIOLOGICAL, MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOCHEMICAL PROPERTIES

V.T Khasanov.¹, Yu.A Varitsev.²,
A.I.Uskov², M Taskulova A..¹,
A.Amirgazin³

¹ «S.Seifullin Kazakh Agro Technical University», Zhenis avenue, 62, Nur-Sultan, 010011, Republic of Kazakhstan, agun.katu@gmail.com.

² Federal state budgetary scientific institution "A.G. Lorch All-Russian Potato Research Institute", Lorkha st., 23, letter B, Moscow region, vil. Kraskovo, Lyubertsy district, 140051, Russia, mail@vniikh.com

³ Republican State Enterprise "National Center for Biotechnology" under the Science Committee of Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, Kurgalzhynskoye road, 13/5, Astana, 010000, Republic of Kazakhstan, info@biocenter.kz

Summary

Based on the ELISA and RT-PCR methods, Kazakhstan and Russian PVS isolates were detected. Using biplex RT-PCR, it was found that Russian isolates contained a mixture of strains (PVS^A + PVS^O), the wheat Kazakhstan isolate PVS - Arosa was identified as a strain PVS^A. PVS isolates showed a smaller a range of modal lengths of virions compared to the known an electron microscopic study of highly purified preparations of Russian. By the method of indicator plants, the Russian isolate PVS -Prestige was assigned to PVS^A and PVS^O, the Kazakhstan isolate PVS -Tustep to PVS^A. On the basis of immunization of rabbits with the preparation of isolate PVS -Prestige, antisera with a titer of specific antibodies of 1: 51200 were obtained and ELISA test systems for PVS with a sensitivity of about 16 ng / ml were constructed.

Key words: Potato virus S, isolates, strains, electron microscopy, indicator plants, *in vitro* potato plants, inoculation, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay.