

Г.М. ШЕВАГА, молодший науковий співробітник

Українська науково-дослідна станція карантину рослин Інституту захисту рослин НААН

С.О. СЛОБОДЯН, завідувач сектору ДНК-технологій

Т.М. ОЛІЙНИК, кандидат сільськогосподарських наук

Р.В. ГРИЦАЙ, науковий співробітник

Інститут картоплярства НААН України

М.М. КИРИК, академік НААН України, доктор біологічних наук,
професор

Національний Університет біотехнології і природокористування
України

ЗТ-ПЛР-ДІАГНОСТИКА ПЕРСПЕКТИВНИХ СОРТІВ КАРТОПЛІ ДЛЯ ЗАХІДНОГО ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Наведено результати досліджень щодо діагностики рослин картоплі на наявність X-, Y-, M-, S-, L-вірусів картоплі та віроїду веретеноподібності бульб картоплі, оздоровлених методом культури in vitro.

віруси, in vitro, ЗТ-ПЛР, діагностика, сорти картоплі

Картопля займає п'яте місце серед джерел енергії в живленні людини після пшениці, кукурудзи, рису і ячменю [1]. Але багаточисельні фітопатогенні мікроорганізми (бактерії, гриби, віруси, мікоплазми), викликають різні хвороби картоплі [10].

Найбільшої шкодочинності в картоплярстві завдають вірусні хвороби. Картопля розмножується вегетативно, тому вірусні хвороби передаються із покоління в покоління, що призводить до поступового зниження продуктивності та її виродження. На сьогоднішній день відомо біля 50-ти вірусів, ідентифікованих на картоплі в різних країнах та регіонах з різними природно-кліматичними умовами [8]. Тільки через ураження найбільш поширеними вірусами X, S, M, Y, L втрачають урожай сягають від 5 до 80%. При цьому погіршується якість продукції [1].

На основі сучасних даних, що опубліковані в світовій літературі, до числа найбільш поширених фітопатогенних вірусів картоплі відносяться: вірус скручування листків картоплі, ВСЛК (*Potato leafroll*

virus); Y-вірус (*Potato virus Y*); X-вірус, ХБК (*Potato virus X*); S-вірус, SBK (*Potato virus S*); M-вірус, MBK (*Potato virus M*); A-вірус (*Potato virus A*); аукуба-мозаїки картоплі (*Potato aucuba mosaic virus*); вірус щіткоподібності верхівки (*Potato top-top virus*); вірус чорної кільцевої плямистості томатів (*Tomato black ring virus*); вірус жовтої карликовості картоплі (*Potato yellow dwarf virus*) [4]. До найбільш поширених в Україні слід віднести: X-, Y-, M-, S-віруси картоплі, ВСЛК.

Широке поширення вірусних інфекцій констатує недостатність уваги до фітовірусологічного контролю в Україні. У галузі картоплярства існує нагальна потреба в розробці методів і засобів діагностики фітопатогенних вірусів, методів оздоровлення рослин, у створенні банку здорових сортів, розробці ефективних систем контролю й захисту насінневого матеріалу на основі визначення фітосанітарного стану [5].

Заходи профілактики вірусних захворювань картоплі потребують проведення експрес діагностики вірусних хвороб. Класичні методи ізоляції та ідентифікації вірусів, що застосовуються у вірусології, займають багато часу та ускладнюють діагностику. Таким чином виникає необхідність застосування новітніх біотехнологій із використанням молекулярно-біологічних методів діагностики, на основі яких лежить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [6].

При виявленні вірусної інфекції, в тому числі й прихованої, застосовують RT-PCR (*Reverse-Transcription-Polimerase Chain Reaction* — полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією — ЗТ-ПЛР) для детекції РНК-вмісних вірусів і віроїдів [7].

Використання полімеразної ланцюгової реакції у насінництві картоплі дає змогу проводити діагностику насінневого матеріалу на наявність різних шкідливих організмів. В основі ПЛР-реакції лежить ампліфікація, тобто копіювання певної послідовності ДНК. Реакція складається із трьох стадій, що відбуваються за різних температур: денатурація, відпал праймерів та синтез нових ланцюгів. 30—50 циклів ПЛР-реакції дають достатню кількість продукту ампліфікації для подальшого його вивчення [8-10].

Метою досліджень є діагностика рослин картоплі *in vitro* на предмет виявлення вірусної інфекції у латентній формі.

Матеріалу та методи. В дослідженні використовували рослини *in vitro* за довготривалого культивування в колекції УкрНДСКР ІЗР, 12 сортів картоплі різних груп стиглості вітчизняної та зарубіжної селекції. Дослідження з діагностики вірусних хвороб проводили в Інституті картоплярства НААН.

РНК з листків картоплі виділяли згідно з методикою *Diatom RNA Prep 100 (IsoGene, Росія)*. Далі шляхом реакції зворотної транскрипції з сумарної РНК отримували (+)РНК комплементарну ланцюгу ДНК (кДНК). До реакції додавали 1 мкг сумарної РНК кожного зразка.

Синтез першого ланцюга комплементарної кДНК ініціювали за допомогою комерційного набору РЕВЕРТА-L (*AmpliSense*, Росія) протягом 1 години при температурі 37°C. Отриману кДНК використовували для реакції ампліфікації.

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили на ампліфікаторі “*Mastercycler personal*” (*Eppendorf*) з використанням набору *GenPak*[®] *RT-PCR Core* з наступним температурним режимом: температура плавлення кДНК — 94°C, відпалу — 55°C, синтезу — 72°C, кількість циклів ампліфікації 35.

Для діагностики вірусів картоплі в мультиплексній реакції використовували праймери до ХВК F (5'- tagcacaacacagggccacag -3', ХВК R 5'- ggcagcattcatttcagcttc -3') 562 п.н.; YBK F (5'- cacgattgctcaagcaaga -3'), YBK R (5'- ggcggagtatgcaccaagta -3') 182 п.н.; SBK F (5'- tggcgaacaccgagcaaatg -3'), SBK R (5'- atgatcgagtccaagggcactg -3') 213 п.н.; LBK F (5'- cgcgcctaacagagttcagcc -3'), LBK R (5'- gcaatgggggtcсаactcat -3') 336 п.н.; PSTV F (5'- ggatccccggggaacctggagcg -3'), PSTV R (5'- ggatccctgaagcgtcctccgagc -3') 360 п.н. [11] — 2001 р. та MBK (M1 5'- ctgaaaatatgcgcsctg -3'; M2 5'- cggcatctgcagttatag -3') 288 п.н., які було розроблено на базі кафедри вірусології Київського Національного Університету імені Тараса Шевченка.

Електрофоретичний розподіл продуктів ампліфікації проводили в 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл) протягом 1 години за напруги 5 В/см² довжини камери. Гель досліджували в умовах ультрафіолетового випромінювання за довжини хвилі 312 нм. Для фотографування використовували цифрову фотосистему. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної маси *GeneRuler 100 bp* (*Fermentas*) та комп'ютерної програми *BioTestColor* (Росія).

Результати досліджень. Важливим етапом роботи в біотехнології оздоровлення є діагностика вірусної інфекції. Правильне поєднання існуючих тест-систем забезпечує своєчасне видалення інфікованих рослин із числа регенерантів та в подальшому фітосанітарний контроль за станом отриманого матеріалу на всіх етапах виробництва насінневого матеріалу.

В результаті проведених досліджень проаналізовано інфікованість рослин *in vitro* найбільш поширеними вірусами картоплі у латентній формі при довготривалому (2006—2013) депонуванні в колекції (табл., рис.).

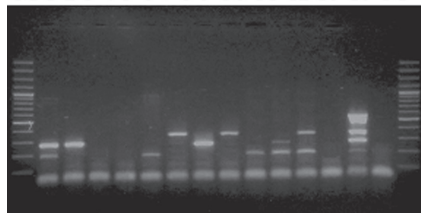
Після проведення реакції ампліфікації в гелі виявлено комплекси: S та M-вірусів (зразки 1, 10); Y- та M-вірусів (зразок 7); L- та S-вірусів (зразок 11). У зразках 5 та 9 наявна смуга амплікону 213 п.н., що свідчить про наявність SBK, а у зразках 6 та 8 присутній продукт ампліфікації 336 п.н., який свідчить про наявність L-вірусу картоплі.

*Результати діагностики латентної форми вірусів картоплі рослин in vitro
(колекція УкрНДСКР ІЗР)*

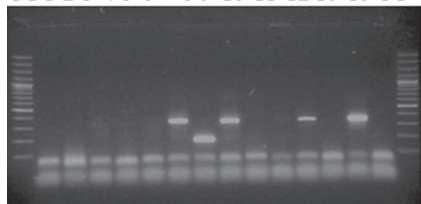
№	Назва сорту	XVK	YVK	SBK	LBK	MBK	ВВВК
	Негативний контроль: К-	-	-	-	-	-	-
	Позитивний контроль: К+	+	-	+	+	+	-
1	Базис	-	-	+	-	+	-
2	Билина	-	-		-	+	-
3	Белла роза	-	-	-	-	-	-
4	Дубравка	-	-	-	-	-	-
5	Васильок	-	-	+	-	-	-
6	Бородянська рожева	-	-		+	-	-
7	Невська	-	+		-	+	-
8	Явір	-	-		+	-	-
9	Поліська рожева	-	-	+	-	-	-
10	Колобок	-	-	+	-	+	-
11	Слов'янка	-	-	+	+	-	-
12	Скарбниця	-	-	-	-	-	-

Рис. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР-аналізу вірусів картоплі:

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 К+К- М



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 К+К- М



К+ — позитивний контроль;
К- — негативний контроль;
М — маркер довжин фрагментів
1–12 — сорти картоплі:
1 — Базис
2 — Билина
3 — Белла роза
4 — Дубравка
5 — Васильок
6 — Бородянська рожева
7 — Невська
8 — Явір
9 — Поліська рожева
10 — Колобок
11 — Слов'янка
12 — Скарбниця

Серед усіх проаналізованих рослин *in vitro* виявлено три зразки, вільні від вірусної інфекції (зразки 3, 4, 12).

Уражені рослини видалено з колекції та буде поновлено після подальшого оздоровлення.

Вільні від вірусної інфекції сорти картоплі Белла роза, Дубравка, Скарбниця переведено в умови *in vivo* для отримання бульбового матеріалу та подальшого репродукування в насінництві.

ВИСНОВКИ

В результаті проведеної діагностики методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією в мультиплексній реакції виявлено три зразки сортів картоплі Белла роза, Дубравка, Скарбниця вільні від вірусної інфекції.

Дані сорти передано для розмноження в системі насінництва.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. *Анисимов Б.В.* Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля / Б.В. Анисимов. — М.: ФГНУ «Росинформгротех», 2004. — 80 с.

2. *Банадысев С.А.* Семеноводство картофеля: организация, методы, технологии / С.А. Банадысев. — Минск, 2003. — 325 с.

3. *Боднарчук А.А.* Наукові основи насінництва картоплі в Україні / А.А. Боднарчук. — К., 2010. — 400 с.

4. *Иванюк В.Г.* Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. — Минск: Белпринт, 2005. — 696 с.

5. *Кушнір Г.П.* Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацкая. — К.: Наук. думка, 2005. — 242 с.

6. *Методичні рекомендації.* Визначення молекулярно-генетичного поліморфізму роду Beta L з допомогою полімеразної ланцюгової реакції. / [М.В. Роїк, Ю.М. Сиволап, Г.П. Петюх та ін.]: Ін-т цукрових буряків УААН. — К., 2007. — 26 с.

7. *Методичні рекомендації.* Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем / [Т.М. Олійник, К.А. Слободян, О.О. Шевченко та ін.]: Ін-т картоплярства НААН. — Немішаєве; К.: ТОВ «КВІЦ», 2012. — 28 с.

8. *Новый метод экспресс-диагностики вирусов картофеля на иммунохроматографических тест-полосках.* — М.: Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха, 2010. — 13 с.

9. *Оздоровлення насінневого матеріалу картоплі та його діагностика в системі біотехнологій* / Т.М. Олійник, К.А. Слободян, С.О. Слободян, Р.В. Грищай // Сільськогосподарська мікробіологія. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. — 2011. — Вип. 14. — С. 156—166.

10. *Фітопатогенні бактерії*. Бактеріальні хвороби рослин: Монографія / Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Яковлева та ін. — К.: ТОВ НВП «Інтресервіс», 2011. — 444 с.

11. *Nie X. A novel usage of random for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers / Nie X., Singh R.P. // Journal of Virological Methods. — 2001. — V. 91 — P. 37—49.*

**Шевага Г.М., Слободян С.О., Олійник Т.М.,
Грицай Р.В., Кирик Н.Н. ЗТ-ПЦР-діагностика перспективних
сортів картофеля для Західної Лесостепі України**

Приведены результаты исследований по диагностике растений картофеля на присутствие X-, Y-, M-, S-, L-вирусов картофеля и вирида веретенообразности клубней картофеля, оздоровленных методом культуры in vitro.

**Shevaga G.M., Slobodyan S.O., Oliynyk T.M.,
Grytsai R.V., Kyryk M.M. RT-PCR-Diagnostics of advanced potato
varieties for Western Forest steppe of Ukraine**

The research results are set out on potato plants diagnostics for presence of viruses X, Y, M, S, L, and of potato tubers spindle viroid, sanitized by method of culture in vitro.