

грин, Р.О. Бондус // Вісн. центру наукового забезпечення АПВ Харківської області. – 2010. – № 10. – С. 115–133.

12. *Международный классификатор СЭВ* видов картофеля селекции *Tuberarium (Dun.) Buk.* рода *Solanum L.* – Л., 1984. – 43 с.

13. Будин, К.З. Генетические основы селекции картофеля / К.З. Будин. – Л.: Агропромиздат, 1986. – 192 с.

14. *Методические указания.* Выделение исходного материала для селекции картофеля на основе генеалогии. – С.Пб., 1992. – 105 с.

**УДК 635.21:632.38:57.083**

**С.О. СЛОБОДЯН, молодший науковий співробітник**

Інститут картоплярства НААН

## **ВІРУСНІ ХВОРОБИ КАРТОПЛІ ТА ЇХНЯ ДІАГНОСТИКА В СИСТЕМІ БІОТЕХНОЛОГІЙ**

---

*Наведено результати досліджень щодо молекулярної діагностики X-та M-вірусів у рослинах in vitro, отриманих у результаті оздоровлення із застосуванням методу культури меристеми в поєднанні з хіміотерапією. Установлено, що при діагностиці X-вірусу картоплі потрібно на 2–3<sup>0</sup> С підвищити температуру гібридизації праймера з кДНК. Виділено 3 лінії сорту Базис та 1 лінію сорту Билина, вільні від M-вірусу картоплі, які після перевірки за господарсько цінними показниками в польових умовах можуть бути занесені до Банку in vitro оздоровлених сортів.*

**Ключові слова:** картопля, віруси, діагностика, імуоферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, зворотна транскрипція

Наразі відомо близько 40 фітопатогенних вірусів, ідентифікованих на картоплі в різних країнах і регіонах з різними

© С.О. Слободян, 2011

Картоплярство. 2011. Вип. 40

природно-кліматичними умовами. На основі сучасних уявлень і свідчень, що опубліковані у світовій літературі в останні роки [1–8], до числа найбільш важливих фітопатогенних вірусів картоплі належать: вірус скручування листків картоплі, ВСЛК (*potato leaf roll virus, PLPV*); Y-вірус, YВК (*potato virus Y, PVY*); X-вірус, ХВК (*potato virus PVX*); S-вірус, SBK (*potato virus S, PVS*); M-вірус, MBK (*potato virus M, PVM*); A-вірус, ABK (*potato virus A, PVA*); аукуба мозаїки картоплі (*Potato aucuba mosaic virus, PAMV*), вірус косматості верхівки, ВКВК (*Potato top top virus, PMTV*); вірус чорної кільцевої плямистості томатів (*Tomato black ring virus, TBRV*); вірус жовтої карликовості картоплі, ВЖКК (*Potato yellow dwarf virus, PYDV*). Серед перерахованих вірусів до найбільш поширених і шкодочинних в Україні належать: X-, Y-, M-, S-, L-віруси картоплі [9–14].

Уперше вірусні хвороби у 1890–1902 рр. почав вивчати російський вчений Д.І. Івановський. У 20-х роках ХХ ст. вірусні хвороби картоплі дослідили голландські вчені Quanjer та ін. [15] (1916) і Botjes [16] (1920). З того часу цьому питанню присвячується велика кількість досліджень як зарубіжних, так і вітчизняних учених [17,18].

Віруси належать до найбільш шкодочинних біологічних об'єктів, які уражують картоплю. Втрати врожаю від важких форм вірусних хвороб, спричинених YВК, ВСЛК, становлять 70–85%, а у деяких випадках – до 100% [19–21]. Віруси X і S знижують урожай у середньому на 10–20 %. Вміст крохмалю в уражених бульбах зазвичай нижче на 0,8–4,6 % порівняно із здоровими рослинами. В них зменшується кількість сирого протеїну, вітамінів С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> [19]. На відміну від бактерій і грибів віруси паразитують у середині клітини і, як правило, знаходяться в усіх органах, що ускладнює захист картоплі від них. Водночас бульбове репродукування культури сприяє збереженню інфекції та її накопиченню [10, 22, 23]. Крім того, погіршується якість бульб – знижується вміст білка, крохмалю, а також товарність. Шкодочинність патогенів вірусного походження полягає і в тому, що їх найважче виявити через

складнощі, пов'язані з внутрішньоклітинним паразитизмом та латентною формою ураження [24]. Саме тому контроль фітопатогенних вірусів є невід'ємною складовою рослинництва на всіх етапах створення й вирощування сортів сільськогосподарських культур, що включає визначення ступеня поширеності захворювань, складу популяції патогенів, розробку заходів щодо обмеження їхнього розповсюдження й шкідливої дії, а також методів і засобів діагностики [25].

При виявленні вірусної інфекції, в тому числі й прихованої, застосовують декілька наукових підходів. Один із них – імуноферментний аналіз – ІФА (Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay – ELISA), запропонований у 1977 р. М. Кларком та А. Адамсоном. Цей метод включає тестування на присутність специфічних білків вірусного капсиду із використанням специфічного зв'язування між експресованим антигеном та антитілом. Інший підхід – високочутливий метод RT-PCR (Reverse-Transcription-Polimerase Chain Reaction – полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією – ЗТ-ПЛР) для детекції РНК-вмісних вірусів [29] і віроїдів [30–33]. В основу методу покладено полімеразну ланцюгову реакцію, яку відкрив К. Мюлліс у 1983 р. [34, 35]. При цьому якість і чистота стартової нуклеїнової кислоти (РНК) є критичними для успішної ЗТ-ПЛР. Загальна і полі-А РНК можуть бути використані як матриця, але обидві повинні бути інтактними і вільними від забруднення геномною ДНК. Специфічне зв'язування полі-А РНК буде збагачувати цільові повідомлення, тому менше реакцій зворотної транскрипції потрібно для подальшої ампліфікації. Ефективність реакції синтезу першого ланцюга, який пов'язаний з якістю РНК матриці, буде також значно впливати на результати подальшої ампліфікації [36].

Одним із найважливіших способів боротьби з вірусними хворобами картоплі є отримання високопродуктивного, оздоровленого насінневого матеріалу і його прискорене розмноження в культурі *in vitro* [26]. При цьому обов'язковим етапом біотехнології оздоровлення рослин картоплі є вірусологічний

контроль з використанням сучасних методів діагностики, які забезпечують надійність результатів, особливо в латентний період інфекції [27, 28].

**Мета досліджень.** Відпрацювати методики виділення рибонуклеїнової кислоти та полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією з метою подальшого їхнього застосування для діагностики оздоровленого матеріалу картоплі на наявність Х- та М-вірусів картоплі.

**Методика й матеріали для досліджень.** Матеріалом для наших досліджень слугували лінії сортів картоплі Оберіг, Луговська, Базис, Билина та Щедрик, оздоровлені із застосуванням методу культури меристеми в поєднанні з хіміотерапією. Для виділення тотальної РНК користувались методикою Boonham N із співавторами [37], а полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією для діагностики Х-вірусу картоплі проводили згідно з методикою X. Nie та R.P. Singh [38]. Діагностику М-вірусу картоплі здійснювали з використанням тест-системи, розробленої на базі кафедри вірусології Київського університету імені Тараса Шевченка.

Полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією проводили на ампліфікаторі «Eppendorf» (Німеччина). Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації виконували у 1,5%-му агарозному гелі, що містив бромистий етидій (0,5 мкг/мл), протягом 2 год при напрузі 3 В/см довжини гелю. Для фотографування використовували цифрову фотосистему. Розміри продуктів ампліфікації визначали за допомогою маркера молекулярної маси GeneRuller 100 bp («Fermentas») та комп'ютерної програми BioTest Color (Росія).

**Результати досліджень.** Для успішного проведення полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією основною умовою є якість та чистота стартової РНК. Тому на перших етапах досліджень було відпрацьовано методики виділення рибонуклеїнової кислоти. Для цього ми використовували по дві лінії сортів картоплі Базис, Билина та Щедрик (рис. 1).

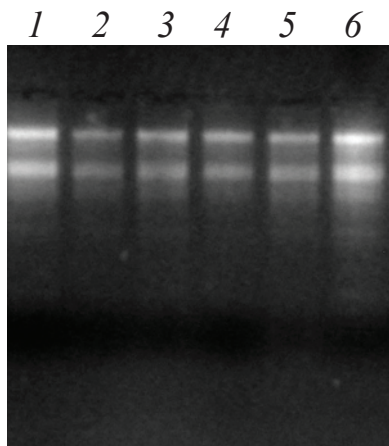


Рис. 1. Гель – виділення  
*тотальної РНК з пробіркових  
рослин картоплі:*

1–2 – лінії сорту Базис; 3–4 –  
лінії сорту Билина; 5–6 – лінії  
сорту Шедрик

З рисунку досить якісно помітно виділену РНК, яку можна використовувати для проведення ЗТ-ПЛР.

Наступним етапом нашої роботи було відпрацювання умов проведення полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією з метою діагностики Х-вірусу картоплі. При цьому ми використовували дві лінії сорту Оберіг та одну лінію сорту Луговська, які за результатами ІФА були уражені даним вірусом. Як негативний контроль використовували здорові рослини картоплі.

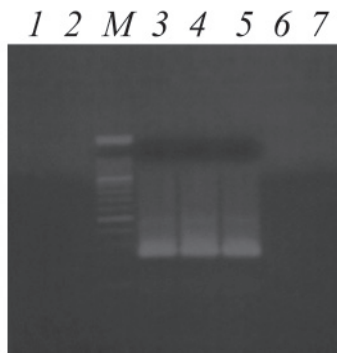
Критерієм наявності ХВК у зразках є їхня флуоресценція в ультрафіолетовому світлі відповідно до очікуваних розмірів, що встановлюється при порівнянні з маркером молекулярної маси ДНК та відповідних контрольних зразків. Після отримання електрофоретичного продукту кожного зразка їх порівнюють із треком ДНК негативного контролю – здорової рослини. Наявність високого рівня специфічного флуоресцентного сигналу в ДНК свідчить про присутність конкретних послідовностей фрагментів Х-вірусу картоплі. Відсутність флуоресцентних сигналів негативного контролю вказує на відсутність конкретних фрагментів. Для контролю можливої контамінації брали додатково дві проби, в які замість кДНК додавали воду.

Після проведення ПЛР-реакції в гелі виявлено продукти ампліфікації, які говорять про наявність у зразках 3–5 Х-вірусу

картоплі (рис.2). Над кожною смугою продуктів ампліфікації помітно шлейфи. Для їхньої нейтралізації потрібно на 2–3°C підвищити температуру гібридизації праймера з кДНК. Отже, в результаті проведених досліджень відпрацьовано методику проведення ЗТ-ПЛР для ефективного виявлення ХВК у пробіркових рослинах картоплі.

Рис. 2. Детекція ХВК за допомогою ЗТ-ПЛР:

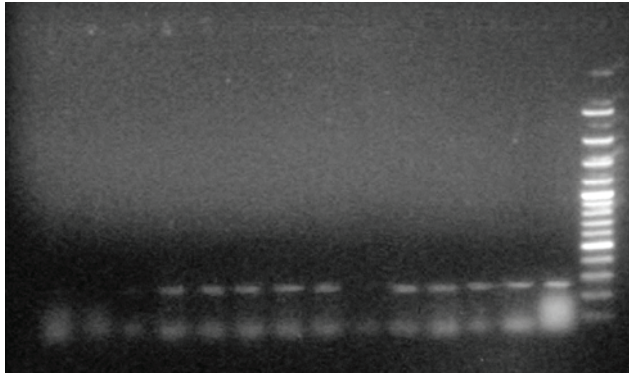
1–2 – негативні контролю (1 – лінія сорту Оберіг; 2 – лінія сорту Луговська); М – маркер молекулярної маси; 3–5 – зразки хворих рослин (3 – Луг78; 4 – Обг 2/5; 5 – Обг 3/7); 6–7 – здорові рослини (6 – Луг66; 7 – Луг37)



Дану технологію молекулярної діагностики ми використовуємо для детекції найбільш поширених та шкодочинних груп вірусної інфекції при одержанні оздоровлених ліній картоплі. Особливо актуальною постає молекулярна діагностика у виявленні вірусних хвороб у латентний період інфекції. Тому використання комплексного підходу при вірусологічному контролі на кожному з етапів оздоровлення дає можливість вибракувати хворий матеріал.

При діагностиці М-вірусу картоплі ми використовували оздоровлені лінії сортів Базис, Билина та Щедрик, які за результатами ІФА були вільні від М-вірусу картоплі. Оздоровлення насінневого матеріалу картоплі від МВК проводили із застосуванням методу культури меристеми в поєднанні з хіміотерапією. Дослідження проводили з використанням прямого та зворотного праймера до М-вірусу картоплі.

Після проведення ПЛР-реакції в гелі виявлено продукти ампліфікації, які свідчать про наявність МВК у зразках 4–8 та 10–13 (рис. 3). Зразки 1–3 та 9 виявилися чисті від вірусної інфекції.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M

Рис. 3. *Продукти ампліфікації М-вірусу картоплі:*

1 – 62 Бз; 2 – 69 Бз; 3 – 21 Бз; 4 – 84 Бз; 5 – 39 Бз; 6 – 9 Бз; 7 – 19 Бз; 8 – 34 Бл; 9 – 15 Бл; 10 – 31 Бл; 11 – 39 Бл; 12 – 5 Бл; 13 – 92 Щед.; 14 – позитивний контроль; M – маркер молекулярної маси

**Висновки.** Таким чином, нами відпрацьовано методику молекулярної діагностики оздоровлених рослин на наявність вірусної інфекції. Установлено, що при діагностиці X-вірусу картоплі потрібно на 2–3° С підвищити температуру гібридизації праймера з кДНК. У результаті оздоровлення сортів картоплі Базис, Билина та Щедрик виділено 4 лінії (62 Бз, 69 Бз, 21 Бз, 15 Бл), вільні від М-вірусу картоплі, які після перевірки за господарсько цінними показниками в польових умовах можуть бути занесені до Банку *in vitro* оздоровлених сортів.

**Перспективи подальших досліджень.** Доцільно проводити розробку та удосконалення методичних підходів діагностики рослин картоплі на наявність найбільш небезпечних груп вірусної інфекції, в тому числі й віроїду веретеноподібності бульб картоплі.

1. *Potato diseases: Diseases, Pest and Defects* / Edited by Dr. D.E. van der Zaag and al.: Copyright, 1996 NIVAA (Netherlands Potato consultative Institute). – 180 p.

2. *Struik, H.C. Seed potato technology* / H.C. Struik and S.G. Wiersema // Wageningen Pers, Wageningen. The Netherlands. – 1999. – 383 p.

3. *Potato*, Global Research and Development / [Editors: S.M. Paul Khurana, G.S. Shekhawat, B.P. Singh and S.K. Pandey]. – Shimla: Indian Potato Association. – 2000. – Vol. 1. – 733 p.

4. *Potato virus vectors and their management*. Potato, Global Research and Development / [Editors: Paul S.M. Khurana, K. Verma and V.K. Chandla]. – Shimla: Indian Potato Association. – 2005. – Vol. 1. – P. 352–362.

5. *Salasar, L.F.* Potato Viruses and their control. International Potato Centre / L.F. Salasar. – Lima Peru, 1996. – 214 p.

6. *Борьба с вирусными болезнями растений* / [Х. Кеглер, Х. Кляйнхемпель, Г. Эртель и др.]. – М.: Агропромиздат, 1986. – 479 с.

7. *Integrated pest management for potatoes in the western United States*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources publication. – 1986. – 146 p.

8. *Картофель: селекция, семеноводство, технология возделывания* / [П.И. Альсмик, В.С. Шевелуха, Х. Ортель и др.]. – Минск: Ураджай, 1988. – 304 с.

9. *Анисимов, Б.В.* Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля (практическое руководство) / Б.В. Анисимов. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2004. – 80 с.

10. *Трофимец, Л.Н.* Вирусные болезни картофеля: приложение к журналу «Защита растений» / Л.Н. Трофимец. – М.: Агропромиздат, 1990. – 79 с.

11. *Московець, С.М.* Вірусні хвороби сільськогосподарських культур / С.М. Московець, А.Д. Бобир, Л.Е. Глушка. – К.: Урожай, 1975. – С. 72–80.

12. *Московець, С.М.* Віруси і вірусні хвороби картоплі / С.М. Московець, Д.П. Грама, Л.К. Жеребчук. – К.: Наук. думка, 1973. – 166 с.

13. *Мельничук, М.Д.* Фітовірусологія / М.Д. Мельничук – К.: Поліграфконсалтинг, 2005. – 200 с.

14. *Картопля*. Практична енциклопедія / за ред. П.С. Теслиука, М.Ю. Власенка, М.Й. Шевчука. – Луцьк: Надстир'я, 2003. – 300 с.

15. *Quanjer, H.M.* Nature, mode of dissemination and control of phloem necrosis (leaf-roll) and related diseases in a. Sereh. Meded. Rijks Hoogere Land-Tuin- en / H.M. Quanjer, H.A.A. Van Der Lek, & J.O. Botjes // Boschloowschool. – 1916. – 10:92. – 138 p.

16. *Botjes, J.G.O.* De bladrolziekte van de aardappelplant / J.G.O. Botjes // H. Veeman en Zonen, Wageningen. – 1920. – 8:1. – 136 p.

17. *Кононученко, В.В.* Картопля / В.В. Кононученко, М.Я. Молоцький. – К., 2002. – Т.1. – 532 с.

18. *Бондарчук, А.А.* Виродження картоплі та прийоми боротьби з ним / А.А. Бондарчук. – Біла Церква, 2007. – 103 с.



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

20. *Шпаар, Б.* Выращивание картофеля / Б. Шпаар, П. Шуман. — М.: ИК Родник, 1997. — 246 с.

21. *Блоцкая, Ж.В.* Вирусные болезни картофеля / Ж.В. Блоцкая. — Минск: Наука и техника, 1993. — 222 с.

22. *Картопля* / [С.П. Васильківський, Ю.Я. Верменко, М.Ю. Власенко]. — Біла Церква: Білоцерків. держ. аграр. ун-т, 2002. — 535 с.

23. *Атлас болезней и вредителей картофеля* / [В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Н.П. Ященко, В.И. Дударевич]. — Минск: СоюзИнформ, 2000. — 64 с.

24. *Детекція та ідентифікація трансгенів у генетично модифікованих рослинах на прикладі Вt-картоплі* / [М.Д. Мельничук, А.В. Дубін, В.Г. Спиридонов, С.Д. Мельничук] // Мікробіол. журн. — 2002. — Т. 64, №3. — С. 26–32.

25. *Молоцький, М.* Картоплярство / М. Молоцький // Картоплярство. — 2000. — №2. — 10 с.

26. *Morel, G.* Guerison de Dahles atteints de une maladie a virus / Morel G., Martin C. // Compt. Rend. — 1952. — V. 235, № 20. — P. 1324–1325.

27. *Nie, X.* Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR / X. Nie, R.P. Singh // J. of Virological Methods. — 2000. — Vol. 86, №2. — P. 179–185.

28. *Sinijärvi, R.* Detection of Potato Virus X by One Incubation Europium Time-resolved Fluoroimmunoassay and ELISA / R. Sinijärvi, L. Järvekülg, E. Andreeva and M. Saarma // J. gen. Virol. — 1988. — Vol. 69. — P. 991–998.

29. *Henson, J.M.* The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis / J.M. Henson and R. French // Annual Review Phytopathology. — 1993. — Vol. 31. — P. 81–109.

30. *Hadidi, A.* Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification / A. Hadidi, X. Yang // J. of Virological Methods. — 1990. — Vol. 30. — P. 261–270.

31. *Yang, Y.S.* Numerical simulation of plasma transport driven by the Io torus / Y.S. Yang, R.A. Wolf, R.W. Spiro and A.J. Dessler // Geophys. Res. Lett. — 1992. — Vol. 19. — P. 957–960.

32. *Rezaian, M.A.* Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis / M.A. Rezaian, L.R. Krake, D.A. Golino // Intervirology. — 1992. — Vol. 34. — P. 38–43.

33. *Levy, A. Y., Sagiv, Y. and Srivastava, D.* Towards efficient information gathering agents. In Etzioni, editor, Software Agents — Papers from the

1994 Spring Symposium (Technical Report SS-94-03), p. 64–70. AAAI Press.: 1994.

34. *Mullis, K. B.* Methods in Enzymology / K.B. Mullis, F.A. Faloona, R. Wu (ed) // Academic Press. – New York, 1987. – Vol. 155. – 335 p.

35. *Saiki, R.K.* Science / R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim. – 1985. – P. 230, 1350.

36. *Источник* для открытия. Путеводитель по методикам и способам применения: третье издание. – Promega –1996 – ISBN 1-882274-57-1 – 404 с. – С. 193–206 (выборочный перевод).

37. *Boonham, N.* The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TagMan) / N. Boonham, P. Smith, K. Walsh, J. Tame, J. Morris, N. Spence, J. Bennison, & I. Barker // J. of Virological Methods. – 2001 – 101: 37. – 48 p.

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

**УДК 635.21:632.42**

**В.В. КИРИЛИШИН, О.О. ГАНІНА, молодші наукові співробітники**

Інститут картоплярства НААН

## **ВИДІЛЕННЯ СЕРЕД СКЛАДНИКІВ ГЕНОФОНДУ КАРТОПЛІ ВИСОКОКРОХМАЛИСТИХ СОРТІВ З ВИСОКИМ ПРОЯВОМ ІНШИХ ГОСПОДАРСЬКО ЦІННИХ ОЗНАК**

---

*Висвітлено результати досліджень оцінки та виділення серед складників генофонду картоплі вихідного матеріалу з високим вмістом крохмалю і проявом інших господарсько цінних ознак. За підвищенням*

© В.В. Кирилішин, О.О. Ганіна, 2011  
Картоплярство. 2011. Вип. 40