

УДК635.21 : 632.38: 577.21

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛАТЕНТНЫХ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР-РВ

© 2024 А.А. Вязовой, А.Л. Бакунов, А.В. Милехин, С.Л. Рубцов, Н.Н. Дмитриева

Самарский федеральный исследовательский центр РАН,  
Самарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. Н.М. Тулайкова

Статья поступила 14.03.2024

Представлены результаты выявления латентных вирусных патогенов картофеля PVS, PVY, PVM методом полимеразной цепной реакции обратной транскрипции в режиме реального времени. Объект исследований - 55 сортов картофеля отечественной селекции. Выделение ДНК из листовых пластин проводили методом органической экстракции. Амплификацию осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ с помощью Амплификатора QuantStudio 5. Показано, что наибольшее количество образцов имеют содержание генетической конструкции вируса PVM (62%), как в комплексе с PVS, PVY, так и в отдельности. Содержание нуклеиновой кислоты вируса PVY наблюдается у 31% образцов, PVS у 29%, комплекс всех 3-х вирусных генов наблюдается у 9% образцов. Отсутствуют генетические конструкции вирусов у 6,6% исследованных образцов.

*Ключевые слова:* картофель, сорт, латентная вирусная инфекция, вирусоустойчивость, полимеразная цепная реакция.

DOI: 10.37313/2782-6562-2024-3-1-9-13

EDN: QBQHW

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно около 40 фитопатогенных вирусов, идентифицированных на картофеле в различных регионах и странах с разнообразными природно-климатическими условиями [1]. К числу наиболее важных фитопатогенных вирусов, получивших практически повсеместное распространение относятся вирусы Y картофеля (УВК), X вирус (ХВК), M вирус (МВК), S вирус (СВК), вириодверетенности клубней картофеля (ВВКК), андийский вирус [2,3]. Картофельное растение может быть заражено одним или чаще несколькими вирусами.

*Вязовой Артём Алексеевич, инженер-исследователь лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: artioo11201@gmail.com*

*Бакунов Алексей Львович, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: bac24@yandex.ru*

*Милехин Алексей Викторович, кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: alekseimilehin@mail.ru*

*Рубцов Сергей Леонидович, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: rubcov\_sl@mail.ru*

*Дмитриева Надежда Николаевна, научный сотрудник лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных растений. E-mail: dmitrievanad55@yandex.ru*

При совместном заражении степень угнетения растения и потери урожая увеличиваются в два-три раза, что является основной причиной снижения продуктивности [4].

В биотехнологии оздоровления и размножения растений картофеля для получения высококачественного посадочного материала требуется диагностика вирусных заболеваний с применением наиболее высокочувствительных методов. Наиболее простые и быстрые – методы иммунодиагностики (капельная агглютинация, преципитация, радиальная иммунодиффузия в агаре и др.). Однако они имеют узкий спектр выявления вирусов и относительно низкую аналитическую чувствительность. Поэтому, наряду с этими методами, используют молекулярные методы, а именно полимеразную цепную реакцию [5,6,7].

ПЦР анализ позволяет выявить вирусные и вириодные заболевания сельскохозяйственных растений даже на ранних стадиях. Данный метод существенно повышает надежность контроля, так как с его помощью ведется анализ непосредственно генома вируса. В анализируемых образцах достаточно всего одной молекулы ДНК искомого фрагмента для его обнаружения при помощи ПЦР [8].

Цель работы - диагностировать методом ОТ-ПЦР-РВ наличие или отсутствие в растительных образцах 3-х РНК вирусов картофеля: PotatovirusS, PotatovirusM, PotatovirusY.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве исследуемого материала использовались листовые пластины 55 сортов картофеля отечественной селекции, проходящих эколого-географическое испытание в рамках КПНИ «Развитие селекции и семеноводства картофеля». Картофель выращивался в 2022-2023 годах на жестком естественном инфекционном фоне в условиях недостаточного увлажнения.

Для выделения ДНК в фарфоровые стерильные ступки с 100 мг листовых пластин картофеля добавляли экстрагирующий буфер в объеме 1 мл, гомогенизировали образцы до получения однородной массы. Добавляли 1 мл экстрагирующего буфера и повторно растирали образцы. Переносили 1 мл гомогенного образца из ступки в 2,0 мл микроцентрифужную пробирку, центрифугировали 4000 об/мин 5 минут на высокоскоростная миницентрифуге MicroSpin 12. Далее добавляли 500 мкл лизирующего раствора и 15 мкл Протеиназы К, перемешивали и инкубировали образцы 30 минут при 60°C, периодически перемешивая пробирки на микроцентрифуге-встряхивателе каждые 5 минут. В новые подготовленные пробирки отбирали 300 мкл супернатанта с последующим добавлением 200 мкл осаждающего раствора (изопропилового спирта) и 40 мкл сорбента (20% w/v SiO<sub>2</sub>), далее перемешивали полученную смесь на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре, перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждые 2 минуты. Центрифугировали пробирки с суспензией 1 мин. при 7 тыс. об/мин., далее аккуратно удаляли надосадочную жидкость не затрагивая сорбент. Осадок промывали 70%-ным водным раствором спирта 3-х кратном объемом 500 мкл и высушивали при 60°C. Элюировали ДНК в 200 мкл ddH<sub>2</sub>O при 60°C 10 мин., периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе каждые 2-3 минуты, затем центрифугировали при 13 500 об/мин в течение 2 минут. Элюат, содержащий очищенный препарат ДНК, в объеме 150 мкл переносили в новые пронумерованные пробирки.

Оценку качества и количества выделенной ДНК проводили спектрофотометрически на

приборе Флуориметр Qubit4. Значения концентрации измеряли на длинах волн: 260нм, 280нм. Далее все образцы приводили к единой концентрации 20 нг/мкл в 1-х ТЕ буфере.

Мультиплексный анализ на наличие или отсутствие вирусной инфекции картофеля проводили с помощью набора реагентов для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом полимеразной цепной реакции в реальном времени совмещенной с реакцией обратной транскрипции «PotatoVirus M, PotatoVirus Y, PotatoVirus S». Исследовались препараты РНК, полученные из листьев полевых растений, образцы с отрицательным (вода) и положительным (смесь 3-х плазмид, содержащих искомые фрагменты РНК картофеля) контролями.

Аmplификацию РНК осуществляли методом ОТ-ПЦР-РВ с помощью Амплификатора QuantStudio 5 Thermofisher. Проведение реакции обратной транскрипции и последующей мультиплексной ПЦР-РВ осуществляется последовательно в одной пробирке в течение одного запуска амплификатора без каких-либо дополнительных манипуляций.

Смешивали в одной пробирке реакционную смесь, смесь ферментов. Полученную смесь перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и центрифугировали в течении нескольких секунд. Разливали полученную смесь по 20 мкл в пробирки на 0,2 мл. Затем в пробирки добавляли по 5 мкл ОКО, исследуемые образцы и ПКО.

Реакцию проводили по схеме амплификации (таблица 1):

Для оценки специфичности реакции амплификации использовали положительный (ПКО) и отрицательный (деонизированная вода) контроли, а также ВПК (внутренний положительный контроль) для исключения ложноотрицательных результатов. В процессе амплификации информация о детекции флуоресценции автоматически передавалась на управляющий компьютер и обрабатывалась программой QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.1. Экспоненциальное накопление копий ДНК в ходе амплификации в виде кривой линии на амплификационном графике, в известном интервале циклов, свидетельствует о наличии генов вирусов, а их отсутствие – об отсутствии соответствующих маркеров.

Таблица 1. Схема амплификации

Шаг	Температура, °C	Время, сек.	Время изменения температуры, °C/s	Регистрация сигнала	Число циклов
Удержание	45	900	3,18		1
Удержание	95	300	3,18		1
ПЦР	95	15	3,18		50
	60	40	2,44	Регистрация	

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования представлены в таблице 2. Наличие показателя «+» говорит о присутствии гена оболочки вируса в образце, наличие показателя «-» об отсутствии соответственно.

Анализируя результаты ПЦР-анализа, мы можем сказать, что большинство изучаемых сортов картофеля (62%) поражены вирусом М в латентной форме. Пораженными комплексом MS

оказались сорта Гала, Ароза, Ильинский, Артур, Восторг, Крутой, Терский, а сорта Холмогорский, Принцесса Натаван, Арамис, Сосруко комплексом МУ. Наличие комплекса вирусов SMYв латентной форме обнаружено в сортах Спринтер, Блоссом, Томичка, Каштак, Кумир. Отсутствуют генетические конструкции вирусов у сортов Красноярский ранний, Орлан, Догота, Глория, Виза, Фарн, Армада, Евпатий, Надежда, Тайфун, Флагман, Кузбасский, Дальневосточный.

**Таблица 2.** Результаты амплификации исследуемых образцов в режиме реального времени

Сортообразец	PVS	PVY	PVM
Гала	+	-	+
Спринтер	+	+	+
Синичка	-	+	-
Холмогорский	-	+	+
Полярный	-	-	+
Башкирский	-	-	+
Арго	-	-	+
Блоссом	+	+	+
Красноярский ранний	-	-	-
Ароза	+	-	+
Ильинский	+	-	+
Ариэль	-	-	+
Артур	+	-	+
Самородок	-	-	+
Двинский	-	-	+
Чародей	-	-	+
Калужский	-	-	+
Бабынинский	-	-	+
Шах	-	-	+
Багира	-	-	+
Орлан	-	-	-
Догота	-	-	-
Тана	-	-	+
Алка	-	-	+
Ника	-	-	+
Глория	-	-	-
Виза	-	-	-
Фарн	-	-	-
Жигулевский	-	+	-
Армада	-	-	-
Евпатий	-	-	-
Восторг	+	-	+
Мираж	-	-	+
Надежда	-	-	-
Тайфун	-	-	-
Флагман	-	-	-
Крутой	+	-	+

Интеллигент	-	-	+
Принцесса Натаван	-	+	+
Розовый чародей	-	-	+
Кетский	-	+	-
Томичка	+	+	+
Кузбасский	-	-	-
Спиридон	+	+	-
Каштак	+	+	+
Кавалер	+	+	-
Кузовок	-	+	-
Тарасов	+	+	-
Чайка	+	-	-
Арамис	-	+	+
Терский	+	-	+
Сосруко	-	+	+
Моряк	-	+	-
Дальневосточный	-	-	+
Кумир	+	+	+

В положительном контрольном образце выявлены все 3 гена вирусов PVS, PVY, PVM, соответствующие стандартным из руководства набора реагентов, что позволяет исключить ложноотрицательный результат исследования. В образце с отрицательным контролем пиков продуктов амплификации не выявлено, что позволяет исключить ложноположительный результат исследования. Наличие пиков ВПК в каждом образце свидетельствует о наличии необходимого количества реакционной смеси и ее специфичности.

Таким образом, после двух лет выращивания на жестком естественном инфекционном фоне, выявлены сорта картофеля, не содержащие вирусную инфекцию в латентной форме: Красноярский ранний, Орлан, Догота, Глория, Виза, Фарн, Армада, Евпатий, Надежда, Тайфун, Флагман, Кузбасский, Дальневосточный. У указанных сортов можно предположить наличие высокой полевой устойчивости или иммунитета к вирусам картофеля Y, S и M.

### СПИСОК ЛИТЕРАУРЫ

1. Кеглер, Х. Борьба с вирусными болезнями растений / Х. Кеглер, Х. Кляйнхемпель, Г. Эртель, Х. Презелер, Х.-Х. Шимански, Х. Шмидт, Т.Д. Шпаар, Т.Д. Вереревская. М.: Агропромиздат, 1986. – 479 с.
2. Рязанцев, Д.Ю. ПЦР-диагностика андийских вирусов картофеля / Д.Ю. Рязанцев, П.Е. Дробязина,

С.К. Завриев // Защита и карантин растений. – 2015. – № 2. – С. 40-42.

3. Симаков, Е.А. Сортовые ресурсы и передовой опыт производства картофеля / Е.А. Симаков, Б.В. Анисимов, А.В. Коршунов и др. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 346 с
4. Артюхова, С.И. Биотехнология оздоровления сибирского картофеля от вирусов: монография / С.И. Артюхова, И. В. Киргизова. Минобрнауки России, ОмГТУ. – Омск: Изд-во ОмГТУ, 2015. – 136 с
5. Власов, Ю.И. Сельскохозяйственная вирусология / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина. – М.: Колос, 1982. – С. 150-164
6. Куликова, В.И. Диагностика вирусных и бактериальных болезней картофеля в оригинальном семеноводстве: Методические рекомендации / В.И.Куликова и др. – Кемерово: Кузбассвуиздат, 2004. – 24 с.
7. Алексеев, Я.И. Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) / Я.И. Алексеев, Ю.В. Белов, Д.А. Варламов и др.// Научное приборостроение. – 2006. – Т. 16. – № 3. – С. 132–136.
8. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени. – 9-е изд. / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов. – М.: Лаборатория знаний, 2022. – 226 с

## IDENTIFICATION OF LATENT POTATO PLANT VIRUSES BY RT-PCR-RV METHOD

© 2024 A.A. Vyazovoy, A.L. Bakunov, A.V. Milekhin, S.L. Rubtsov, N.N. Dmitrieva

Samara Scientific Research Institute of Agriculture named after N.M. Tulaykov –  
Branch of the SamSC RAS

The results of the detection of latent viral pathogens of potato PVX, PVY, PVZ by polymerase chain reaction reverse transcription in real time are presented. The object of research is 55 varieties of potatoes of domestic selection. DNA extraction from leaf plates was carried out by organic extraction. Amplification was carried out by RT-PCR-RV using the Quant Studio 5 Amplifier. It was shown that the largest number of samples have the content of the genetic structure of the PVM virus (62%), both in combination with PVS, PVY, and separately. The nucleic acid content of the PVY virus is observed in 31% of the samples, PVS in 29%, the complex of all 3 viral genes is observed in 9% of the samples. There are no genetic constructs of viruses in 6.6% of the studied samples.

*Keywords:* potato, variety, latent viral infection, virus resistance, polymerase chain reaction.

DOI: 10.37313/2782-6562-2024-3-1-9-13

EDN: QBQHWD

### REFERENCES

1. *Kegler, X. Bor'ba s virusnymi boleznyami rastenij / X. Kegler, X. Klyajnhempel', G. Ertel', X. Prezeler, H.-H. Shimanski, X. Schmidt, T.D. Shpaar, T.D. Vererevskaya. M.: Agropromizdat, 1986. – 479 s.*
2. *Ryazancev, D.Yu. PCR-diagnostika andijskih virusov kartofelya / D.Yu. Ryazancev, P.E. Drobyazina, S.K. Zavriev // Zashchita i karantin rastenij. – 2015. – № 2. – S. 40-42.*
3. *Simakov, E.A. Sortovye resursy i peredovoj opyt proizvodstva kartofelya / E.A. Simakov, B.V. Anisimov, A.B. Korshunov i dr. M.: FGNU «Rosinformagrotekh», 2005. – 346 s*
4. *Artyuhova, S.I. Biotekhnologiya ozdorovleniya sibirskogo kartofelya ot virusov: monografiya / S. I. Artyuhova, I. V. Kirgizova. Minobrnauki Rossii, OmGTU. – Omsk: Izd-vo OmGTU, 2015. – 136 s*
5. *Vlasov, Yu.I. Sel'skokozyajstvennaya virusologiya / Yu.I. Vlasov, E.I. Larina. – M.: Kolos, 1982. – S. 150-164*
6. *Kulikova, V.I. Diagnostika virusnyh i bakterial'nyh boleznej kar tofelya v ori ginal'nom semenovodstve: Metodicheskie rekomendacii / V.I.Kulikova i dr. – Kemerovo: Kuzbassvuzizdat, 2004. – 24 s.*
7. *Alekseev, Ya.I. Pribory dlya diagnostiki biologicheskikh ob"ektov na osnove metoda polimeraznoj cepnoj reakcii v real'nom vremeni (PCR-RV) / Ya.I. Alekseev, Yu.V. Belov, D.A. Varlamov i dr.//Nauchnoe priborostroenie. – 2006. – T. 16. – № 3. – S. 132–136.*
8. *Rebrikov, D. V. PCR v real'nom vremeni. – 9-e izd. / D.V. Rebrikov, G.A. Samatov, D.Yu. Trofimov. – M.: Laboratoriya znaniy, 2022. - 226 s*

*Artem Vyazovoy, Research Engineer of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants.*

*E-mail: artioo11201@gmail.com*

*Aleksey Bakunov, Candidate of Agricultural Sciences, Leading Research Associate of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants. E-mail: bac24@yandex.ru*

*Aleksey Milekhin, Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory of Biotechnology of Agricultural Plants.*

*E-mail: alekseimilehin@mail.ru*