

На правах рукописи

КИРГИЗОВА ИРИНА ВАСИЛЬЕВНА

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ МИКРОКЛОНОВ *SOLANUM
TUBEROSUM* L. НА ЗАРАЖЕНИЕ МОЗАИЧНЫМ ВИРУСОМ (PVS)**

Специальность: 1.5.21 – Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация выполнена на кафедре биотехнологии ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Калашникова Елена Анатольевна**,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ
ВО «Российский государственный аграрный
университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Зайнуллин Владимир Габдуллович**,
доктор биологических наук, профессор
ведущий научный сотрудник отдела
сельскохозяйственной геномики Института
агробиотехнологий им. А.В.Журавского ФИЦ
Коми НЦ УрО РАН - обособленное
подразделение ФГБУН Федерального
исследовательского центра «Коми научный
центр Уральского отделения Российской
академии наук»

Федорова Юлия Николаевна,
доктор сельскохозяйственных наук, профессор,
ректор ФГБОУ ВО «Великолукская
государственная сельскохозяйственная
академия»,

Ведущая организация: ФГБУ «Всероссийский центр карантина
растений»

Защита диссертации состоится «24» апреля 2024 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета диссертационного совета 35.2.030.09, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте www.timacad.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

Киракосян Рима Нориковна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Культура картофеля (*Solanum tuberosum* L.) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Картофель – экономически важный продовольственный продукт и важнейший компонент в мировом сельском хозяйстве, являющийся круглогодичным источником витаминов В₂, В₆, В₁, В₃, С, РР, К и минеральных веществ.

Однако, несмотря на достаточно большой объем производства картофеля в России, широко используются в промышленном картофелеводстве сорта зарубежной селекции. Общей тенденцией многих хозяйств г.Омска и Омской области является переход на усиленную посадку сортов иностранной селекции картофеля (до 75%) в общем объеме посадочного материала. В связи со сложившейся обстановкой в мировой политике, вызванной введением санкций и сокращением импорта семенного картофеля, использование сортов немецкой и голландской селекции картофеля предопределило зависимость отечественных картофелеводческих предприятий от импорта исходного генетического материала картофеля, а также вследствие недостаточного контроля скрытой вирусной инфекции у импортируемого картофеля наблюдается снижение качественных показателей, что приводит к большим экономическим потерям. Вирус PVS является широко распространенным стрессором на территории региона, поражающим картофель, который приводит к снижению урожая до 20% и вызывает у растений углубление жилок, морщинистость, крапчатость, некроз листьев и жилкование.

Стратегически важным приоритетом обеспечения продовольственной безопасности Российской Федерации является сокращение зависимости от сортов картофеля иностранной селекции. Это можно достичь за счет внедрения современных методов биотехнологии воспроизводства отечественного картофеля и использование традиционных методов, а также продвижение отечественных сортов картофеля на внутренний рынок.

Для агропромышленного комплекса Омской области представляется перспективным вовлечение отечественных сибирских сортов картофеля, как высокоурожайных и устойчивых к климатическим особенностям региона в селекционный процесс. Для дальнейшего выведения новых сортов картофеля с комплексом хозяйственно-ценных признаков, таких как устойчивость к вирусам и продолжительностью хранения, важно иметь разнообразный исходный материал с богатой генетической основой. Сочетание традиционных и биотехнологических методов является эффективным в создании новых сортов с одновременным повышением продуктивности и устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам.

Таким образом, для эффективного получения и использования генетических ресурсов и реализации морфогенетического потенциала картофеля, необходимо проведение исследований, направленных на изучение физиологического ответа в ответ на инфицирование вирусной инфекцией у соматоклональных вариантов отечественного картофеля. Изучение

антиоксидантной системы защиты у картофеля является одним из важных направлений селекции и клеточной инженерии растений, как для фундаментальных, так и прикладных исследований.

Особое значение оно приобретает при культивировании каллусных тканей картофеля *in vitro*. Реализация морфогенетического потенциала обуславливается комплексом взаимосвязанных факторов, которые оказывают влияние на соматическую изменчивость у регенерантов в зависимости от генетических особенностей сорта.

Целью наших исследований является изучение физиологического ответа микроклонов картофеля (*S. tuberosum* L.) на заражение мозаичным вирусом PVS.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследований:

1. Изучить зависимость каллусогенеза от типа первичного экспланта, гормонального состава питательной среды и условий культивирования.

2. Разработать протокол получения растений–регенерантов изучаемых сортов картофеля из длительно пассируемой каллусной ткани.

3. Провести сравнительный анализ содержания крахмала и белка в клубнях микроклонов и контрольных растений сибирских сортов картофеля.

4. Провести сравнительный анализ изменений активности антиоксидантных ферментов пероксидазы (КФ 1.11.1.7), каталазы (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) у микроклонов и контрольных растений сибирских сортов картофеля в ответ на заражение вирусом PVS.

5. Исследовать изменения в спектре изоформ пероксидазы (КФ 1.11.1.7), каталазы (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) у микроклонов и контрольных растений сибирских сортов картофеля в ответ на заражение вирусом PVS.

Научная новизна диссертационного исследования. Впервые для сортов сибирской селекции проведены исследования физиологического ответа микроклонов *S. tuberosum* L., полученных из длительно культивируемой каллусной ткани *in vitro*, в ответ на инфицирование мозаичным вирусом PVS.

Впервые для сибирских сортов картофеля (Хозяюшка, Алена, Ермак) установлена зависимость каллусогенеза от типа первичного экспланта (листовые и стеблевые), гормонального состава питательной среды и условий культивирования. Показано, что выращивание листовых эксплантов на питательной среде, содержащей 2,4–Д (5 мг/л) в сочетании с кинетином (0,25 мг/л) при температуре (26±2⁰С), приводило к формированию каллусной ткани в 98%–100% случаев, в то время как при использовании стеблевых эксплантов – 60%. Образование каллусной ткани было более интенсивным при культивировании эксплантов в условиях полной темноты, и в присутствии в составе питательной среды 2,4–Д и кинетина. В условиях светокультуры отмечено формирование морфогенной каллусной ткани.

Установлено, что в клубнях соматических клонов картофеля отмечается вариабельность по содержанию крахмала и белка по сравнению с

контрольными растениями. Повышенное содержание крахмала (25,3%) и белка (3,0 г) было отмечено у микроклона ХС-94, полученного от среднеспелого сорта картофеля Хозяюшка, а повышенное содержание белка (1,48 г) – у микроклона АС-91, полученного от сорта Алена.

Впервые установлено, что у инфицированных вирусной инфекцией микроклонов картофеля сибирской селекции общий уровень активности ферментов пероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы повышается по сравнению с контрольными растениями, за исключением микроклонов, полученного от восприимчивого к вирусам сорта картофеля Ермак.

Впервые установлено, что инфицирование вирусом PVS микроклонов картофеля приводит к изменению изоферментного состава антиоксидантных ферментов пероксидазы (КФ 1.11.1.7), каталазы (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1). При определении изоферментного спектра пероксидазы у контрольной группы растений выявлена активность 4–5 изоформ, в то время как у инфицированных растений 5–6 изоформ. В результате определения активности каталазы также отмечены изменения: у контрольных растений 1 изоформа, у инфицированных 3 изоформы. Для микроклона ЕС-1 (исходный сорт Ермак), отмечался синтез дополнительного изофермента, что подтверждает появление признака, отличного от исходного сорта. Установлено, что инфицирование растений вирусом приводит к изменению изоферментного состава супероксиддисмутазы и появлению двух изоформ: Fe – и Cu/Zn – SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования антиоксидантной системы и защитного иммунитета растений.

Научно – практическая значимость работы.

Полученные растения – регенеранты изучаемых сортов картофеля могут быть включены в качестве донорных растений в схему классической селекции, направленной на увеличение генетического разнообразия культуры. Кроме того, разработанный протокол получения растений–регенерантов из длительно пассируемой каллусной ткани может быть применен и для других растений семейства *Solanaceae*.

Результаты диссертационной работы можно использовать в учебном процессе при чтении лекций и проведении лабораторно – практических работ по дисциплинам: «Физиология растений», «Сельскохозяйственная биотехнология», «Прикладная биотехнология», «Культура клеток и тканей растений» для студентов, обучающихся по направлениям «Агрономия» и «Биотехнология».

Результаты работы внедрены в учебном процессе ОмГТУ при чтении лекций и проведении лабораторно – практических работ направления подготовки бакалавриата «Биотехнология»

Проведена опытная апробация результатов работы на базе лабораторий «Микроклонального размножения» ЗАО ТПК «Элита–картофель» и ООО «Элита» (г.Омск).

Методология и методы диссертационного исследования.
Методологической основой диссертационной работы являются классические

естественно – научные законы и методы научного познания, комплексный подход к анализу научных трудов отечественных и зарубежных ученых по вопросам физиологических реакций растений в ответ на стрессоры окружающей среды. Для реализации поставленных задач исследования применялись общенаучные и специальные методы сбора, обработки и анализа информации, метод культуры клеток и тканей растений, биохимического анализа и статистической обработки данных. Подробно методология и методы исследования описаны в разделе «Объекты и методы исследований».

Степень достоверности результатов работы подтверждается 4–кратной повторностью и 2–3 аналитическими повторностями экспериментов с применением стандартных методов исследования; использованием поверенного оборудования, имеющего установленный предел отклонений; полученными данными со статистическими достоверными различиями ($p < 0,05$) и использованием графических редакторов и программного обеспечения.

Положения, выносимые на защиту:

– особенности получения каллусных культур *S. tuberosum* L. из различных первичных эксплантов *in vitro*.

– особенности содержания крахмала и белка у соматклонов картофеля *S. tuberosum* L.

– действие вируса PVS⁰ на активность антиоксидантных ферментов и изоферментный состав пероксидазы (КФ 1.11.1.7), каталазы (КФ 1.11.1.6), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) у микроклонов *S. tuberosum* L.

Апробация результатов работы.

Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на конференциях различного уровня, в том числе Международных и Всероссийских научно – практических и научно – технических конференциях: X Международной научно – технической конференции «Динамика систем, механизмов и машин» (Омск: ОмГТУ, 2016); Международной научно–практической конференции, посвященной 100 – летнему юбилею Омского ГАУ «Научные инновации – аграрному производству» (Омск: Омский ГАУ, 2018); XI Международной мультikonференции по биоинформатике, регуляции и структуры геномов и системной биологии «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology–BGRS\SB – 2018» (Новосибирск: ИЦИГ, 2018); Всероссийской научно–практической конференции с международным участием «Биотехнология и общество в XXI веке» (Барнаул: АлтГУ, 2018); XIII Международной научной конференции «Наука и образование – 2018» (Астана, 2018); XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Минск, 2018); X Региональном форуме предпринимательства «Свое дело – твой успех» (Омск: Департамент городской экономической политики Администрации города Омска, 2019); Международной конференции «Биологические науки» (Нур – Султан, 2020);

Международной научной конференции «Настоящее и будущее биотехнологии растений» (Минск, 2023); Всероссийской научной конференции с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» (Иркутск, 2023).

Личное участие автора в получении научных результатов. Все основные положения диссертационной работы разработаны автором лично. Автору принадлежит общая постановка научных проблем, выбор объекта и предмета исследований, поиск источников информации.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ в отечественных и зарубежных изданиях, в том числе 1 статья в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 4 - в научных изданиях, индексируемых международными базами данных, перечень которых определен в соответствии с рекомендациями ВАК РФ (Scopus, Web of Science и SA(pt)).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах компьютерного текста; состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследований, экспериментальной части), выводов, списка литературы и приложений. Работа содержит 8 таблиц, 30 рисунков и 8 приложений. Библиографический список включает 294 источника, в том числе 201 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования.

В первой главе представлен анализ научно – технической литературы по вопросам, касающимся функционирования антиоксидантной системы растений при действии стрессоров.

Во второй главе описана организация работы, объекты и методы исследований. Основные исследования проводились на базе лабораторий ФГБОУ ВО РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева.

Объектами исследований служили сибирские сорта картофеля Алена, Ермак, Хозяюшка, выведенные специалистами ГНУ СибНИИСХоз СО РАСХН (ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»). Исследования проводили на микроклонах картофеля (*S.tuberosum L*), полученных из каллусных культур в ходе выполнения исследований.

Получение первичной каллусной культуры, пассирование, индукцию стебельного органогенеза проводили по методике Е.А. Калашниковой с некоторыми модификациями. Для изучения сравнительной характеристики каллусобразующей способности сортов картофеля, был выбран состав питательной среды по прописи минерального состава МС с дополнительным внесением регуляторов роста: 2,4 – дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4–Д) в концентрации от 1 до 5 мг/л и 6 – фурфуриламинопурин (кинетин) в концентрации от 0,05 до 0,25 мг/л. Культивирование проводили при 22±25⁰С, освещенности 1500 лк, в условиях светового дня – 12 часов (30 суток), после

пробирки переносили в камеру с освещенностью 5000 лк (30 суток). Для регенерации растений из каллусной ткани использовали питательную среду, в состав которой входили зеатин (1,0 мг/л), ИУК (0,1 мг/л), фолиевая кислота (0,5 мг/л), глюкоза (10000 мг/л), сахароза (30000 мг/л). Полученные растения в дальнейшем клонировали путем микроклонального размножения согласно ГОСТ 29267–91, 2010 на агаризованной питательной среде с дополнительным внесением 0,5 мг/л феруловой кислоты, 1 мг/л кинетина, 1 мг/л тиамин, 1 мг/л пиридоксина, 20 000 мг/л сахарозы.

На кафедре «Биотехнология» РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева была получена коллекция безвирусных микроклонов сортов Алена, Ермак, Хозяюшка. Получение соматоклональных вариантов картофеля проводили с активно растущим каллусом 1, 7 и 19-го пассажей, которые отличались по фенотипическим показателям. Пассирование проводили через 3 недели культивирования. Растения – регенеранты после 4 месяцев культивирования для адаптации переносили на 10–15 суток в пластиковые горшочки, которые содержали перлитовый песок, затем переносили в горшочки со смесью торфа и песка в соотношении 3:1, после укоренения в полевые условия. Почву в теплице обрабатывали 0,1% перманганатом калия и препаратом Фундазол для исключения грибной инфекции. Растения высаживали на расстоянии 15-20 см друг от друга и на 4 сутки выращивания производили полив раствором Кнопа. В качестве маркерных признаков акцентировали внимание на цвет мякоти и окраску цветка. Клубни первой репродукции тестировали по фенотипическим признакам (цвет мякоти, окраска кожуры) и отобранные образцы использовали для получения клубней второй репродукции, которые были использованы для оценки содержания крахмала и количества белка.

Содержание крахмала в клубнях картофеля проводили методом кислотного гидролиза по методу описанному Ермаковым А.И., 1972, Saqib, A.N., 2011. Количество белка определяли по методу Лоури О.Н.

Инфицирование проводили мозаичным вирусом картофеля PVS⁰ (DSMZ PV – 0838). Растения инокулировали через листовые пластинки при микроповреждении карборандумом и свежеприготовленной смесью вирусных частиц и фосфатного буфера. Диагностику растений на наличие вирусов картофеля проводили методом иммуноферментного анализа (DAS–ELLISA) на иммуноферментном анализаторе (Labsystems Multiskan plus, фильтр 405 нм, Thermo Scientific) с использованием тест – систем на вирусы PVY, PVX, PVM, PVS, PLRV, контрольных положительных и отрицательных тест – планшетов, согласно инструкции и иммунохроматографических экспресс – тестов (AgriStrip set 100, Bioreba).

Определение уровней активности антиоксидантных ферментов осуществляли на спектрофотометре (Pharmacia LKB Ultrospec III UV/Vis 9245, США) с использованием кварцевых кювет (10*10*45 (L) мм) по ГОСТ 8.229–81. Определение активности пероксидазы осуществляли колориметрическим методом при длине оптической плотности 590 нм,

ежесекундно в течение 120 сек. Определение активности каталазы проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм в течение 120 сек. Активность супероксиддисмутазы определяли по способности ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия с некоторыми модификациями по описанию Giannopolitis C. N. Поглощение формазана, образованного в результате реакции, измеряли при длине волны 560 нм, за единицу активности SOD (ед.) принимали количество фермента, необходимое для 50% ингибирования фотовосстановления нитросинего тетразолия.

Разделение изоформ антиоксидантных ферментов осуществляли методом нативного ПААГ– электрофореза белков в неденатурирующих условиях на приборе Bio–Rad «Tetra cell Mini protein 3». Окрашивание проводили Кумаси R-250, молекулярные массы ферментов были получены в результате обработки электрофереграммы с помощью программы BioCapt (разрешение 800 dpi) (Vilber Lourmat). Определение изоферментов пероксидазы проводили в модифицированной системе по Андерсон, Борг и Микаэльсон со сдвигом заряда. Сдвиг заряда («charge shift») проводили за счет внесения в верхний электродный буфер SDS (0,01%), при этом нижний буфер имел тот же состав. Рабочий гель полимеризовали в 0,375 М трис-HCl (pH 8,8), а формирующий гель – 0,0625 М трис-HCl (pH 6,8). Активность фермента проявляли с помощью субстрата, содержащего 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH 5,5), 100 мкл 3% раствора перекиси водорода, 20 мг 3,3, 5,5-триметилбензидина. Гель инкубировали в субстрате до появления характерных полос бирюзового цвета на прозрачном фоне геля, после субстрат сливали и промывали гель 10% уксусной кислотой.

Визуализацию активности каталазы *in gel* проводили с использованием двухкомпонентного субстрата модифицированным методом предложенным J.M. Chandlee и J.G. Scandalios. Гели окрашивали 1% гексацианоферрата (III) калия и 1% хлорида железа (III) до проявления бесцветных (прозрачных) полос на окрашенном в темный зеленый или сине – зеленый цвет фоне. Активность пероксидазы *in gel* проявляли с помощью субстрата, содержащего 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (pH 5,5), 100 мкл 3% раствора перекиси, 20 мг 3,3', 5,5'–триметилбензидина, гель инкубировали в субстрате до появления характерных полос бирюзового цвета на прозрачном фоне геля.

Определение активности изоформ супероксиддисмутазы проводили согласно протоколу предложенному С.Н. Beauchamp и I. Fridovich с небольшими модификациями. Гель с исследуемыми образцами после проведения нативного электрофореза промывали трижды в течение 5 минут дистиллированной водой, далее гель инкубировали в 0,1% растворе NBT в течение 15 минут с внесением 4% этанола при покачивании на шейкере (80 об/мин) в условиях полной темноты. После инкубирования гель промывали дистиллированной водой трижды и инкубировали в 50мМ натрий – фосфатном буфере (pH 7,8) с содержанием 28 мМ рибофлавина, 28 мМ TEMED, 0,25 мМ NBT на шейкере (80 об/мин) в течение 15 минут в условиях

темноты. После инкубации гель промывали, иллюминировали в гелъдокументирующей системе (Fusion–FX6–XT 820.WL/M) под УФ – облучением в течение 30 – 45 минут при температуре 20 – 25⁰С до появления бесцветных бэндов SOD на темно – фиолетовом фоне геля. Идентификацию изоформ ферментов SOD проводили путем обработки гелей в растворах ингибиторов 3 мМ KCN и 5 мМ Н₂О₂ за 30 мин до окрашивания.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программ Microsoft Office Excel 2010, GraphPad Prism (v 6.01) (GraphPad Prism User Guide, 2019). Для выявления различий между парами выборок использовался двухвалентный непарный t–критерий Стьюдента (неравная дисперсия двух выборок). Эксперименты по определению ферментов *in gel* проводили в четырехкратной повторности и 2–3 аналитических повторностях. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения (\pm SD) при помощи графического редактора ImageJ, статистический анализ (one – way Annona test) проведен посредством программного обеспечения GraphPad Prism (v.6.01).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В третьей главе обоснован выбор перспективных сортов сибирской селекции и описаны их основные хозяйственно – ценные признаки. Выбор в качестве высокоурожайных и перспективных сортов картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка был основан на проведенных маркетинговых исследованиях на территории г.Омска и Омской области среди разных возрастных и социальных групп на основании опроса. Сорта отличаются разной восприимчивостью к вирусам, поражающим растения картофеля, срокам созревания. По результатам оценки спроса в 2020 – 2021г. (рис.1) среди 500 жителей, занимающихся выращиванием картофеля на своих ЛПХ, было установлено, что наиболее известными и пользующимися спросом среди населения были ранние сорта Ермак (86%) и Алена (81%) (Киргизова, И. В., 2017), а также среднеспелый сорт Хозяюшка – 76%.

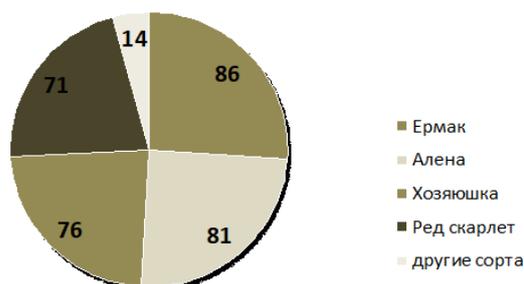


Рис.1 Востребованность сортов картофеля на территории г.Омска и Омской области среди населения разных возрастных групп (%)

На основании опроса сорта Ермак, Алена, Хозяюшка были использованы для проведения экспериментов.

1. Получение каллусной ткани картофеля из листовых и стеблевых эксплантов в условиях *in vitro*

В результате исследований установлено, что листовые экспланты картофеля обладают более высокой способностью образовывать каллусную ткань, по сравнению со стеблевыми эксплантами. Кроме того, эта

особенность была характерна для всех изучаемых сортов. Поэтому в работе использовали только каллус, полученный из листовых эксплантов картофеля различных пассажей. Питательные среды отличались по содержанию фитогормона 2,4-Д (1–5 мг/л). В качестве контрольного варианта использовали безгормональную питательную среду по минеральному составу Мурасиге – Скуга (МС) (Табл. 1).

Таблица 1 – Состав питательных сред для получения каллусов картофеля *in vitro*

Компоненты	Питательные среды, мг/л					
	Контроль	№1	№2	№3	№4	№5
Макросоли МС	50	50	50	50	50	50
Микросоли МС	1	1	1	1	1	1
Fe-хелат МС	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Тиамин НСІ	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Пиридоксин НСІ	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100
Глицин	2	2	2	2	2	2
Глютамин	25	25	25	25	25	25
Кинетин	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
2,4-Д	–	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

Визуальные наблюдения показали, что начало каллусогенеза на листовых эксплантах отмечено на 7 – 9 сутки с начала культивирования. Наиболее интенсивный каллусогенез наблюдали на питательной среде, содержащей 5 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина. В этих условиях формировалась каллусная ткань средней плотности, светло – желтого цвета с меристематическими участками, из которых в дальнейшем формировались растения – регенранты. В отличие от контрольного варианта на исследуемых питательных средах отмечали начало образования каллуса в виде клеточных образований разного размера. Процесс формирования каллуса проходил более активно при культивировании эксплантов картофеля в условиях полной темноты, не зависимо от ориентировки эксплантов на питательной среде, что согласуется с данными М. М. Khalafalla, К. G. A. Elaleem (Khalafalla M. M., 2010).

При использовании питательных сред содержащих 2,4-Д и кинетин, каллусообразование наблюдали на всех вариантах питательных сред, за исключением контрольного варианта. Процесс инициации образования каллусных культур при использовании 2,4-Д в концентрации 1 мг/л и кинетина 0,25 мг/л наблюдалась на 17 сутки культивирования (№2), на питательной среде содержащей 2,4-Д – 3 мг/л процесс образования каллусов наблюдался на 11–14 сутки (№4). Следует отметить, что при культивировании эксплантов на средах №4 и №5 с содержанием 2,4-Д (4–5 мг/л) и кинетина (0,25 мг/л), наблюдали формирование каллусов на 7–10 сутки культивирования, что согласуется с научными данными К. Elaleem, М.М. Khalafalla (Elaleem К., 2009). Отмечено, что каллусогенез эксплантов картофеля, культивируемых в условиях полной темноты на питательных

средах с содержанием 2,4-Д и кинетина, характеризовался высокой пролиферативной активностью. При культивировании эксплантов в условиях освещенности каллусные культуры характеризовались наличием белого налета на поверхности и образованием мелких глобулярных структур по периферии (рис.2).



Рис.2 Каллус картофеля с образованием глобулярных структур

Наиболее интенсивно каллусогенез протекал на питательной среде № 5 добавлением 5 мг/л 2,4 – Д и 0,25мг/л кинетина (рис. 3).

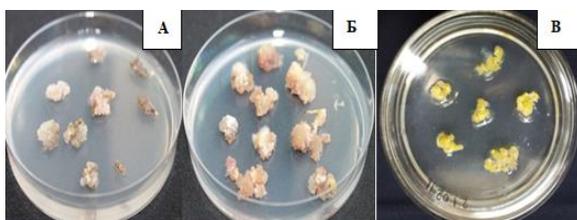


Рис 3. Каллусные культуры, индуцированные из листовых эксплантов сортов картофеля Ермак (А), Алена (Б) и Хозяюшка (В) на 15 сутки культивирования

По результатам исследований установлено, что способность к каллусообразованию листовыми эксплантами (75–80%) у сорта Ермак была выше, чем у стеблевых эксплантов (25%). Отмечается так же, что у сорта Алена стеблевые экспланты индуцировали каллусы на 5–6 сутки культивирования (61%), а листовые экспланты индуцировали каллусные культуры – на 12 сутки культивирования (85%) (рис.4).

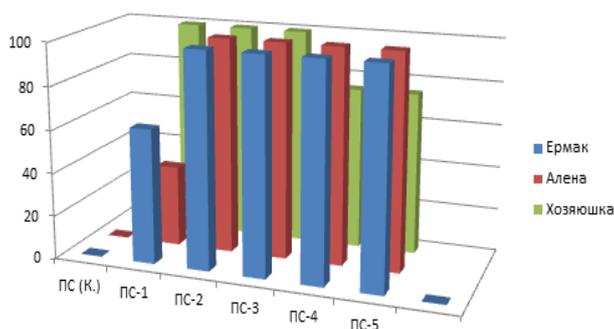


Рис.4 Каллусообразующая способность картофеля в зависимости от состава питательной среды у сортов картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка

В табл.2 представлены данные по количеству листовых эксплантов способных образовывать каллусную ткань, исходному количеству первичных эксплантов и каллусообразующей способности в зависимости от гормонального состава питательной среды.

В табл.3 представлены данные о каллусообразующей способности листовых эксплантов картофеля в зависимости от концентрации 2,4-Д в питательной среде. Следует отметить, что среди изучаемых генотипов картофеля меньшую способность к формированию каллусов показал сорт Хозяюшка.

Таблица 2 – Каллусообразующая способность разных типов эксплантов картофеля на питательной среде ПС – 5 (5мг/л 2,4 – Д и 0,25 мг/л кинетина)

Наименование сорта картофеля	Каллусообразующая способность, %	
	Листовые Экспланты	Стеблевые экспланты
Ермак	100,0	48,0±4,0
Алена	95,0±2,0	60,0±5,0
Хозяюшка	85,0±2,0	61,0±5,0

Таблица 3 – Каллусообразующая способность картофеля в зависимости от состава питательной среды

Концентрация 2,4-Д, мг/л	Исходное количество эксплантов, шт.			Количество эксплантов индуцировавшихся каллус, шт			Каллусообразующая способность, %		
	Ермак	Алена	Хозяюшка	Ермак	Алена	Хозяюшка	Ермак	Алена	Хозяюшка
МС (Контроль)	32	32	32	–	–	–	–	–	–
П–1 (1мг/л)	32	32	32	20	12	32	62,5	37,5	38
ПС–2 (2мг/л)	32	32	32	32	32	32	75	75,5	75
ПС–3 (3мг/л)	32	32	32	32	32	32	95	90,5	80
ПС–4 (4мг/л)	32	32	32	32	32	24	100	100	85
ПС–5 (5мг/л)	32	32	32	32	32	24	100	100	90

Сорта картофеля Алена и Ермак продемонстрировали 100% способность формировать каллусную ткань на средах с содержанием 2,4–Д в концентрации (4–5 мг/л.). Сорт Хозяюшка обладал 100% каллусообразующей способностью на питательной среде, содержащей 2,4–Д 3 мг/л. В этих условиях формировалась каллусная ткань средней плотности, светло–желтого цвета с меристематическими участками, из которых в дальнейшем формировались растения – регенранты (Рис. 5, А, В).

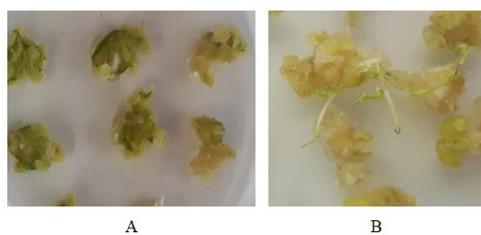


Рис.5 Индукция каллусообразования у стеблевых эксплантов картофеля: А – морфогенная каллусная ткань с участками плотной паренхимной и меристематической ткани, В – каллусная ткань средней плотности, светло – желтого цвета с меристематическими зонами

Интенсивный процесс каллусообразования наблюдали на 22 – 25 сутки культивирования. Установлено, что для всех изучаемых сортов картофеля максимальной способностью к формированию каллусов обладали листовые экспланты по сравнению со стеблевыми эксплантами, поэтому при

проведении дальнейшей серии экспериментов, использовали только каллус, полученный из листовых эксплантов картофеля.

2. Регенерация растений из каллусных культур и получение соматклонов *in vitro*

Из морфогенных каллусных культур на питательной среде по минеральному составу МС с дополнительным внесением феруловой кислоты и кинетина были получены растения – регенеранты картофеля, свободные от вирусных инфекций, в количестве 150 растений каждого сорта (рис.6).

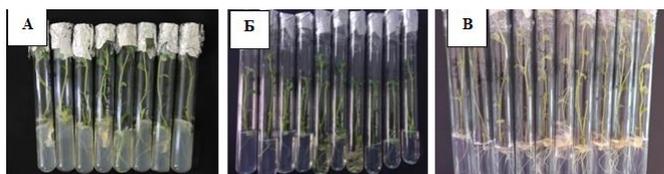


Рис.6. Растения – регенеранты, полученные из каллусной ткани сортов: А – Ермак, Б – Алена, В – Хозяюшка

В результате анализа растений – регенерантов, полученных из каллусной ткани после культивирования *in vitro* в течение 1–2 месяцев, установлено, что большинство растений, полученных после кратковременного культивирования (до 2–х месяцев) имели нормальную морфологию и высокую жизнеспособность. Только у двух регенерантов были отмечены различные аномалии развития – формировались побеги с укороченными междоузлиями. В результате более длительного культивирования *in vitro* (3 – 4 месяца), наблюдали более выраженное проявление отличий в морфологии – формировались побеги с укороченными междоузлиями и измененной формой листовых пластинок. Кроме того, при пересадке растения в условия *ex vitro* наблюдалось увеличение числа погибших растений. В результате исследований после 4 месяцев культивирования было получено 1915 растений – регенерантов, которые были перенесены в почвенные условия, и к концу вегетации получено 8618 клубней первой репродукции.

3. Соматклональные варианты картофеля, полученные из каллуса

Растения–регенеранты были получены из каллуса после 4 месяцев культивирования. В результате выращивания растений в горшочках было получено до 80% жизнеспособных растений картофеля. На рис.7 представлены растения – регенеранты картофеля выращиваемые в горшочной культуре.

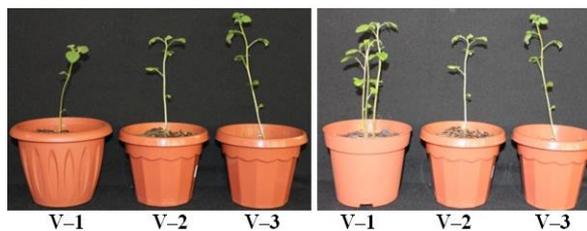


Рис.7 Растения – регенеранты картофеля выращиваемые в горшочной культуре с автоклавированной почвой (14 сутки культивирования): V–1 – сорт Ермак, V– 2 – сорт Хозяюшка, V– 3 – сорт Алена.

Все полученные клубни были оценены по таким маркерным признакам как цвет мякоти и окраска цветка. На основании визуальных исследований установлено, что не по всем выбранным маркерным признакам была выявлена изменчивость у образцов. Так, например, стабильным признаком оказалась окраска цветков у растений картофеля. Что касается цвета мякоти, то по результатам морфологического анализа были отобраны образцы, различающиеся между собой и от контрольного варианта по этому признаку. В контроле цвет мякоти у сорта Алена был белый, в то время как в опытных образцах – бледно-желтый и желтый, у образцов, полученных через каллусную ткань от сорта Ермак, цвет мякоти был белый, но отсутствовали красные включения. Наибольший интерес представляли образцы картофеля ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94, которые отличались от исходных линий растений по морфологическим признакам. На рис.8 представлены клубни картофеля второй репродукции, полученные от соматоклональных образцов картофеля.



Рис. 8 Клубни картофеля второй репродукции:
 V–1 – соматоклональные образцы, полученные от сорта Ермак,
 V–2 – соматоклональные образцы, полученные от сорта Хозяюшка,
 V–3 – соматоклональные образцы, полученные от сорта Алена.

Клубни второй репродукции, отобранные на основании фенотипических отличий образцов, были использованы для проведения анализа по некоторым биохимическим показателям – количеству содержания крахмала и белка (рис.9, 10). Согласно данным, полученным в ходе исследования, среди образцов клубней картофеля соматоклональных линий наблюдалась вариабельность по содержанию крахмала.

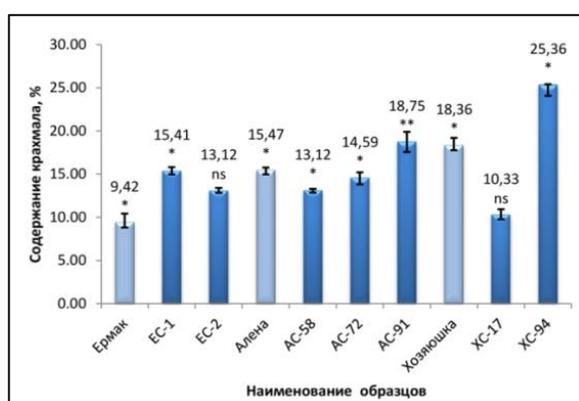


Рис.9 Общее содержание крахмала в клубнях картофеля соматоклонов, полученных на основе сибирских сортов, где Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль; ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94 соматоклональные образцы картофеля. Обозначения: * значительная ($P < 0,05$); ** очень значительная ($P < 0,001$); ns – незначительна ($P > 0,05$) разница в содержании крахмала в клубнях между контрольными сортами и соматоклонами.

Отобранные на основании отличительных морфологических признаков соматоклональные образцы картофеля ЕС–1 превосходили по содержанию крахмала (15,41%) контрольное значение, которое для сорта Ермак составляло (9,42%), а у образца ЕС–2 (13,12%) отмечена незначительная разница по содержанию крахмала по сравнению с контролем. Необходимо отметить, что образец ЕС–1 характеризовался нетипичным цветом мякоти

клубней, отсутствием красных включений. Общее содержание крахмала у сорта Алена составляло 15,47%, в то время как, у соматклонов АС–58 – 13,12% и АС–72 14,59%. Однако данные показатели не превышало контрольное значение. Следует отметить, что соматклон АС–91 с повышенным содержанием крахмала (18,75%) по сравнению с контрольным вариантом (15,47%) характеризовался нетипичным цветом мякоти, который имел светло–фиолетовый оттенок и более темный цвет кожуры. Общее содержание крахмала у сорта Хозяюшка составляло 18,36%. Содержание крахмала у образца картофеля ХС–17–10,33%, что было значительно ниже по сравнению с контролем. У образца картофеля ХС–94 содержание крахмала составило 25,36% и существенно превышало показатели в контрольном варианте. Аналогичные исследования проводились С.П. Бурловым, которые показали, что среди изучаемых раннеспелых, среднеспелых сортов и гибридов по содержанию крахмала максимальное значение было отмечено у среднеспелых сортов картофеля (Бурлов С. П., 2019). В наших исследованиях так же установлено, что наибольшее количество крахмала содержал среднеспелый сорт картофеля Хозяюшка (18,2%) и его соматклональный вариант ХС–94 (25,3%) по сравнению с ранними сортами Алена и Ермак.

По такому показателю, как содержание белка в клубнях картофеля, исследуемые образцы варьировали (рис. 10).

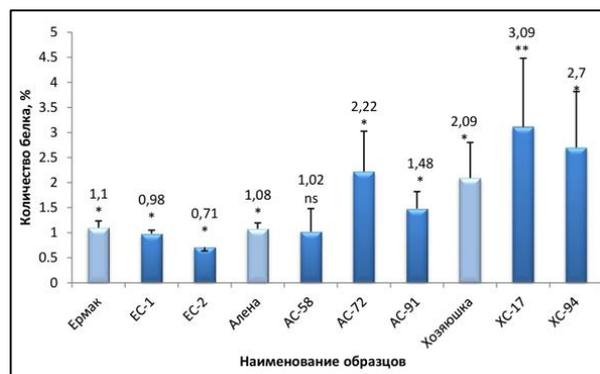


Рис.10. Общее содержание белка в клубнях картофеля соматклонов, полученных на основе сибирских сортов, где Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль; ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94 соматклональные образцы картофеля. Обозначения: * значительная ($P < 0,05$); ** очень значительная ($P < 0,001$); ns – незначительна ($P > 0,05$) разница в содержании белка в клубнях между контрольными сортами и соматклонами.

Согласно данным, представленным на диаграмме, у раннего сорта картофеля Ермак в контрольном варианте количество белка составляло 1,10%. Данный показатель был выше по сравнению с содержанием белка у соматклональных образцов ЕС–1 (10,98%) и ЕС–2 (0,71%). По содержанию белка в клубнях картофеля интерес представлял образец АС–72 с содержанием белка 2,22%, что превышало показатель контрольного образца сорта Алена (1,08%) и образцов АС–58 (1,02%) и АС–91 (1,48%). Среди соматклонов картофеля сорта Хозяюшка были отмечены соматклоны ХС–17 (3,09%) и ХС–94 (2,70%), которые отличались повышенным содержанием белка по сравнению с сортом Хозяюшка (2,09%). На основании проведенных исследований было установлено, что увеличение продолжительности культивирования *in vitro* сопровождалось повышением частоты соматклональной изменчивости и увеличением измененных признаков. Это подтверждает данные, ранее полученные другими авторами (Решетников В.Н., 2004), полученные на 7–ми исследуемых соматклональных образцах

картофеля, отобранных на основании отличительных признаков по морфологии. По содержанию крахмала наиболее высокие показатели имели образцы ЕС–1, АС–91, ХС–94, а по содержанию белка – АС–72 и ХС–17, что при сохранении данного признака, положительно скажется на лежкости клубней.

4. Инокуляция растений вирусной инфекцией

Проведена инокуляция растений картофеля штаммом вируса PVS⁰ в возрасте 4 недель со сходными морфологическими признаками (высотой, развитием листовых пластин, общей вегетативной массы). Инокуляция контрольной группы растений проведена фосфатным буфером с карборандумом без вирусных частиц. Растения картофеля, инфицированные вирусом, не проявляли внешних признаков развития и распространения вирусной инфекции на растениях (Рис. 11).

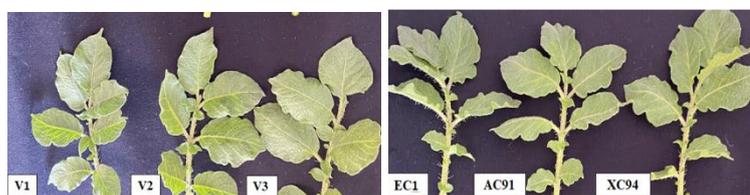


Рис.11 Инфицированные растения картофеля с отсутствием проявления признаков развития инфекции: V1 – сорт Ермак, V2– сорт Алена, V3– сорт Хозяюшка; EC1, AC91, XC94 – соматональные образцы картофеля

Результаты успешного инфицирования растений картофеля вирусом PVS⁰, были подтверждены экспресс – диагностикой ИХА. На рис.12 представлены результаты ИХА тестов (Bioreba, AgriStrip), которые позволили отобрать инфицированные растения.



Рис.12 Диагностика иммунохроматографическими экспресс – тестами растений картофеля, инфицированных вирусом PVS⁰

Для достоверности полученных результатов, отобранные растения после ИХА диагностики были проверены с помощью ИФА. Результаты тестирования растений картофеля представлены в таблице 4.

Диагностика растений картофеля сибирских сортов Ермак, Алена, Хозяюшка методом ИФА – диагностики, показала наличие вируса PVS при отсутствии других мозаичных вирусов у исследуемых образцов, которые использовали для дальнейшей серии экспериментов. Сомнительные образцы были выбракованы.

Таблица 4 – Тестирование сортообразцов картофеля на наличие вирусной инфекции с использованием набора тестеров к вирусам (ИФА, оптическая плотность на приборе Multiskan plus, фильтр 450)

Наименование образца	Оптическая лотность пробы	Положительный контроль	Отрицательный Контроль	Вирус(+/-)
PVX				
Ермак	0,053	0,788	0,058	–
Алена	0,054	0,788	0,058	–
Хозяюшка	0,052	0,788	0,058	–
ЕС–1	0,067	0,788	0,058	–
ХС–94	0,024	0,788	0,058	–
АС–91	0,073	0,788	0,058	–
PVY				
Ермак	0,095	0,987	0,054	–
Алена	0,057	0,987	0,054	–
Хозяюшка	0,083	0,987	0,054	–
ЕС–1	0,033	0,987	0,054	–
ХС–94	0,048	0,987	0,054	–
АС–91	0,055	0,987	0,054	–
PVS				
Ермак	0,821	0,993	0,051	+
Алена	0,793	0,993	0,051	+
Хозяюшка	0,837	0,993	0,051	+
ЕС–1	0,994	0,993	0,051	+
ХС–94	0,892	0,993	0,051	+
АС–91	0,796	0,993	0,051	+
PVM				
Ермак	0,110	0,789	0,044	–
Алена	0,071	0,789	0,044	–
Хозяюшка	0,196	0,789	0,044	–
ЕС–1	0,102	0,789	0,044	–
ХС–94	0,097	0,789	0,044	–
АС–91	0,065	0,789	0,044	–
PLRV				
Ермак	0,053	0,827	0,038	–
Алена	0,066	0,827	0,038	–
Хозяюшка	0,051	0,827	0,038	–
ЕС–1	0,055	0,827	0,038	–
ХС–94	0,064	0,827	0,038	–
АС–91	0,043	0,827	0,038	–

5. Определение активности пероксидазы у микроклонов картофеля

В результате экспериментов по определению растворимой пероксидазы у микроклонов полученных из каллусов разных по восприимчивости генотипов картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка была отмечена повышенная активность растворимых пероксидаз, в процессе инфицирования вирусной инфекцией при сравнении с контрольными растениями. Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинции восстановленного аскорбата ($2,8\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$) и выражали как мкМ АК/мин·мг белка. Исследования показали, что у микроклонов сорта Хозяюшка ХС–94

прослеживалось увеличение уровней РОХ, по сравнению с контрольной группой растений (Рис.13).

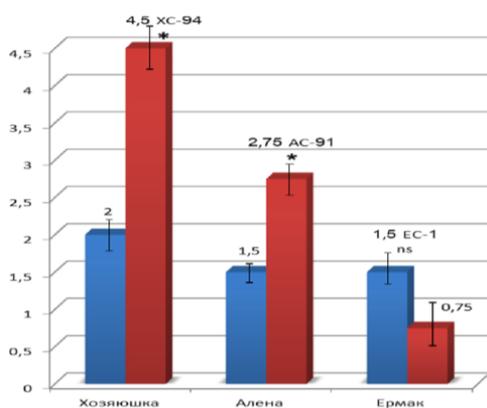


Рис.13. Определение общей активности РОХ картофеля при инфицировании вирусом PVS⁰, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматклона соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматклональными вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Обозначения: * значительная ($P < 0,05$); ns – незначительна ($P > 0,05$) разница в активности РОХ между контрольными сортами и микроклонами

Наибольшая активность ферментов пероксидазы была отмечена у микроклонов ХС–94, где среднее значение общей активности РОХ составляло (мкМ АК/мин·мг белка) 4,5, в контроле – 2,0; у микроклонов ЕС–1 – 1,5, в контроле – 0,75, а у микроклонов АС–91 – 1,5, в контроле 2,75. Наиболее значительные различия в активности ферментов между опытными и контрольными растениями были отмечены в нижних листьях картофеля. Как показывают данные рис.13, специфические изменения активности РОХ у исследуемых генотипов картофеля, отмеченные после инокуляции вирусом, а именно значительное повышение активности у генотипов сортов Хозяюшка и Алена, может играть немаловажную роль в защитном ответе растений картофеля на воздействие биотического стрессора – вирусной инфекции по сравнению с восприимчивым сортом картофеля Ермак, у которого отмечали снижение активности фермента.

Полученные данные согласуются с исследованиям проводимыми зарубежными учеными, в которых различная активность растворимых ионно– и ковалентно связанных РОХ была обнаружена у разных по восприимчивости сортов картофеля с различными реакциями на инфекцию вирусом PVY^(NTN) (Milavec M., 2008). Наиболее выраженные изменения были обнаружены у устойчивых к вирусам сортов картофеля Pentland Squire и Sante, где активность фермента была вдвое больше, чем в контрольной группе растений. Следует отметить, что сорт картофеля Sante показал повышенную активность всех трех типов РОХ в верхних не инокулированных листьях, также как и устойчивый сорт картофеля Хозяюшка показал быструю и общесистемную реакцию на инфекцию вирусом PVS⁰ по сравнению с контролем. Нами отмечена большая активность пероксидаз у среднеспелого сорта картофеля Хозяюшка, обладающего умеренной устойчивостью к фитовирусам, у которого уровень активности растворимых пероксидаз был выше, по сравнению с ранними сортами Алена и Ермак. Меньшая активность пероксидаз была отмечена у генотипа сорта Ермак. Причем после инфицирования уровень активности фермента снижался, что коррелирует с восприимчивостью данного сорта к

возбудителям вирусных инфекций и необходимостью в дополнительной защите растений при выращивании.

6. Определение активности каталазы у микроклонов картофеля

В результате исследований по определению активности каталазы было установлено, что у сорта картофеля Ермак отмечали наибольшую активность фермента по сравнению с контрольными растениями и по сравнению с другими изучаемыми сортами. Активность САТ рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции перекиси водорода ($40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и выражали как $\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$.

У опытной группы растений картофеля, инфицированных вирусом, уровень активности фермента САТ отличался общим повышением активности при сравнительном анализе с контрольными растениями. (рис.14).

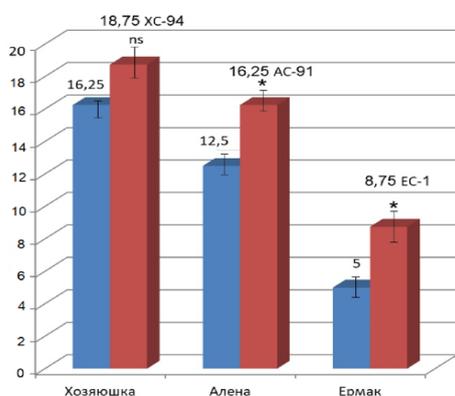


Рис.14 Определение общей активности САТ картофеля при инфицировании вирусом PVS⁰, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматического соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматическими вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Обозначения: * значительная ($P < 0,05$); ns – незначительна ($P > 0,05$) разница в активности САТ между контрольными сортами и микроклонами.

В образцах полученных из листьев микроклонов инфицированных вирусом, отмечали повышенную активность фермента по сравнению с контрольной группой у всех изучаемых сортов. Однако, инфицированный микроклон ХС–94 показал незначительное повышение активности фермента, а у микроклонов АС–91 и ЕС–1 отмечено большее увеличение активности фермента. У образца ХС–94 среднее значение общей активности каталазы составляло ($\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$ белка): – 16,25, в контроле – 18,25, у образца АС–91 – 12,5, в контроле – 16,25, у образца ЕС–1 – 3,75 в контроле 10,0. Отличия активности САТ у опытной и контрольной группы растений отмечали в листьях нижнего яруса у всех генотипов картофеля. Полученные результаты согласуются с исследованиями El-DougDoug K.A. и Sofy A.R по определению активности антиоксидантных ферментов, в частности, фермента САТ у различных по восприимчивости сортов картофеля при инфицировании вирусом PVY.

В наших исследованиях отмечена большая активность фермента у восприимчивого и умеренноустойчивого сортов картофеля по сравнению с устойчивым сортом картофеля. Причем показатели активности САТ у сорта Хозяюшка изменились незначительно, несмотря на то, что в начале измерений составляла 16,25, что было выше уровней активности ферментов у других изучаемых сортов картофеля. Повышенная активность САТ в

инфицированных микроклонах картофеля может быть прямо ассоциирована с увеличением аккумуляции перекиси водорода при распространении вирусной инфекции PVS⁰. Кроме того, активация фермента может быть частью вирусной стратегией для подавления защитных механизмов растений картофеля. Снижение аккумуляции молекул перекиси водорода в пораженных участках растений, может приводить к снижению окислительного стресса у картофеля и повышению их восприимчивости к инфекции.

7.Определение активности супероксиддисмутазы у микроклонов картофеля

Согласно полученным данным и проведенного анализа по определению активности супероксиддисмутазы у инфицированных растений, были отмечены различия в активности фермента по сравнению с контрольной группой. Наибольшее увеличение активности молекул SOD (ед./мг белка) было отмечено у микроклонов, полученных из каллусов сорта Хозяюшка, где среднее значение составляло у инфицированного образца ХС–94 – 5,5, и в контроле 2,5. У микроклонов, полученных из каллусной ткани сорта Алена, АС–91 отмечено незначительное изменение ферментативной активности – у инфицированных растений – 7,5 и в контроле 7,0, а у микроклона сорта Ермак ЕС–1 не выявлено изменений активности SOD по сравнению с контролем. У инфицированных микроклонов сорта Ермак ЕС–1 и в контрольной группе среднее значение составляло – 3,5 (рис. 15).

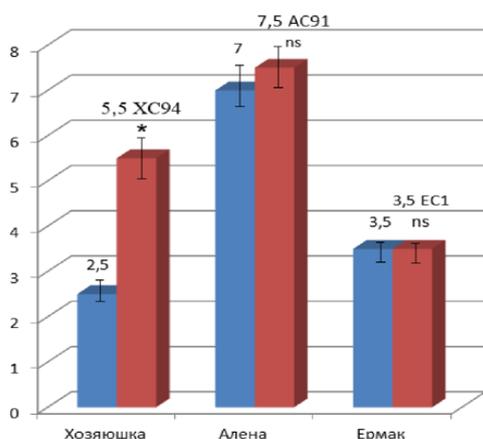


Рис.15 Определение общей активности SOD картофеля при инфицировании вирусом PVS⁰, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматклона соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматклональными вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Обозначения: * значительная ($P < 0,05$); ns – незначительна ($P > 0,05$) разница в активности SOD между контрольными сортами и микроклонами

Как показывают данные, изменения в активности SOD у исследуемых сортов и микроклонов картофеля, зафиксированные после инфицирования вирусом PVS⁰, а именно значительное увеличение ферментативной активности у сортов Хозяюшка и Алена и отсутствие увеличения активности фермента у восприимчивого сорта Ермак могут играть значительную роль в защитном ответе растений картофеля в ответ на воздействие патогена.

8.Определение активности пероксидазы *in gel*

Результаты определения активности изоферментного спектра пероксидаз у растений картофеля показали разницу в активности ферментов при инфицировании вирусом. Отмечена значительная активность POX у сортов

Хозяюшка и Алена, и меньшая активность проявлялась у микроклона ЕС–1, однако была выше по сравнению с контрольной группой. Стоит отметить, что общее количество пероксидазных полос в инфицированных растениях сибирских сортов значительно варьировалось в сторону увеличения или отсутствия изменений по сравнению со здоровыми растениями картофеля (Рис.16).

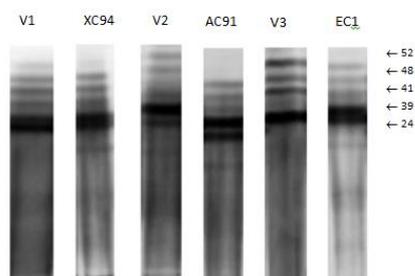


Рис.16 Определение изоферментного спектра РОХ картофеля где, V1–Хозяюшка, V2–Алена, V3–Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы; ХС–94, АС–91, ЕС–1, образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений. Обозначения: 52, 48, 39, 24 (кДа) – молекулярные массы изопероксидаз, выраженные в кДа.

При определении изоферментного спектра у контрольной группы (К) растений сортов Ермак, Алена и Хозяюшка была выявлена активность 4–5 изоформ – РОХ–1, РОХ–2, РОХ–3, РОХ–4, РОХ–5, в то время как у инфицированных растений отмечали активность 5–6 изозимов РОХ–1, РОХ–2, РОХ–3, РОХ–4, РОХ–5, РОХ–6. В таблице 5 представлены данные по количеству изоформ РОХ у растений картофеля инфицированных микроклонов и контрольных растений.

Таблица 5 – Изозимы ферментов РОХ у растений картофеля при инфицировании PVS вирусной инфекцией

РОХ – изозимы	Сибирские сорта картофеля		
	Хозяюшка	Алена	Ермак
Контрольные растения	5	5	4
Микроклоны	6	5	5

Предполагается, что разница в активности изоферментного спектра между устойчивыми и восприимчивым сортами картофеля при инфицировании возможна за счет разницы в механизмах активации ферментов. Результаты показывают более высокое содержание изоформ РОХ у микроклонов ХС–94, полученных от сорта Хозяюшка, у сорта Алена умеренно стойчивого к фитовирусам не отмечали дополнительных изозимов, по сравнению образцом ЕС–1, полученного от сорта Ермак, у которого при инфицировании отмечали появление дополнительного изозима. Следует отметить, что, возможно, у восприимчивого сорта картофеля Ермак фермент синтезировался *de novo*, в отличие от устойчивых сортов картофеля Хозяюшка и Алена, у которых запускался не только механизм активации фермента *de novo*, но и происходила активация ранее существовавших молекул фермента, которая проявлялась в яркости окрашивания полос (Граскова И.А., 2008). У устойчивого сорта Хозяюшка и его соматонального образца происходила активация изопероксидаз и на геле наблюдали интенсификацию окраски полос, что свидетельствовало об увеличении активности фермента, а также дальнейшему своевременному запуску

сигнальных механизмов. Полученные нами результаты показали снижение активности пероксидазы у соматклона ЕС–1 относительно контроля, но при этом наблюдался синтез дополнительной формы фермента, что возможно связано с отличием характеристик у полученного соматклонального образца картофеля и исходного сорта Ермак, чувствительного к вирусным и бактериальным инфекциям. Предполагается, что у полученного соматклонального образца отмечается активация другого сигнального пути за счет активации антиоксидантных ферментов, например, таких как каталаза и супероксиддисмутаза. Это может привести к получению растений–регенерантов с новыми признаками, которые будут представлять интерес для селекционной работы.

9. Определение активности каталазы *in gel*

Согласно научным исследованиям, у растений картофеля присутствует несколько изоформ каталазы. Причем известно, что как минимум две изоформы можно обнаружить в листьях растений картофеля (Scandalios J.G., 1997; Iwamoto M., 2000). В результате определения активности САТ у здоровых растений контрольной группы сортов Ермак, Алена, Хозяюшка наблюдали активность одной изоформы каталазы – Cat1 (Рис. 17).

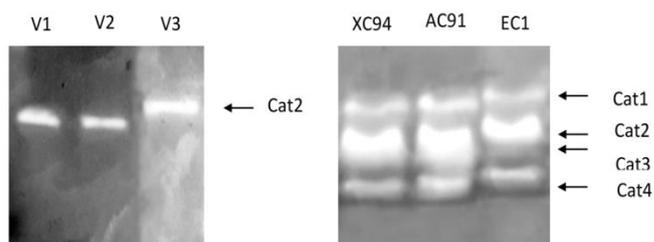


Рис.17 Определение *in gel* активности изоформ САТ картофеля где, V1–Хозяюшка, V2–Алена, V3–Ермак, образцы, контрольной группы; XC–94, AC–91, EC–1, образцы, инфицированной вирусом группы растений; Cat1–Cat 4 – изоформы каталазы.

В растениях, инфицированных вирусом дополнительно к изоформам Cat1, обнаруженных в образцах, экстрагированных из листьев контрольных растений, произошла активация дополнительных изоформ, которые были обозначены как Cat2, Cat3 и Cat4. Следует отметить, что на электрофореграмме у инфицированного образца ЕС–1 была отмечена активность 4-й формы каталазы Cat3, которая отсутствовала у образцов AC–91 и XC–94. Верхняя полоса с молекулярной массой 78кДа была условно обозначена как Cat1. Среднюю полосу с большей активностью и меньшей молекулярной массой 58 кДа обозначили как Cat2. Форма каталазы Cat3 имела молекулярную массу не более 55кДа, а форма Cat4 имела массу около 48 кДа.

Полученные нами результаты показали увеличение активности каталазы у всех изучаемых соматклональных образцов относительно контроля. Однако, при этом наблюдали синтез дополнительной формы фермента (Cat3, 54 кДа), что возможно связано с отличием характеристик у полученного соматклонального образца картофеля и исходного образца сорта Ермак. Таким образом, полученные данные показывают, что в ответ на повышенную аккумуляцию перекиси водорода при вирусной инфекции PVS во всех изучаемых сортах картофеля происходило повышение активности САТ. При

детекции фермента в нативном геле была обнаружена активация дополнительных изоформ, которые не были отмечены в геле контрольного варианта. Наличие нескольких изоформ САТ было отмечено другими авторами и для таких растений как табак, фасоль, кукуруза, клеверина, хлопок, сосна, арабидопсис и бесцветник (Kavitha R., 2008; Corpas F.J., 1999).

10. Определение активности супероксиддисмутазы *in gel*

В результате экспериментов в микроклонах выявлены две изоформы фермента: Fe- и Cu/Zn-SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования защитного иммунитета растений (Рис.18).

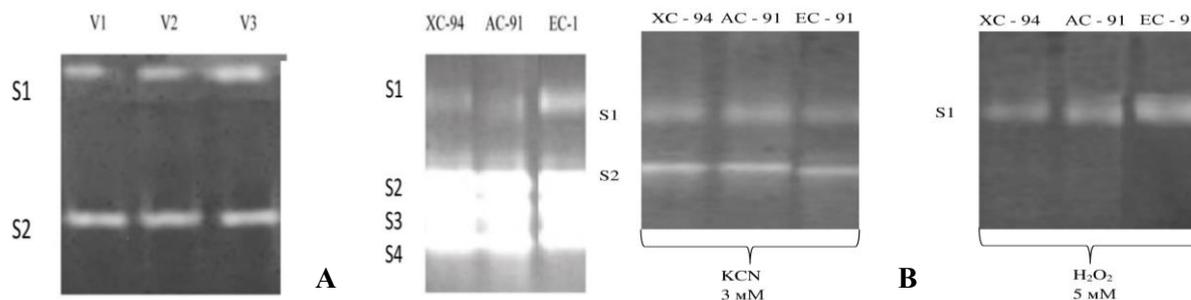


Рис.18 Определение *in gel* активности изоформ SOD картофеля:

А. Определение изоформ SOD в листьях картофеля, где V1 – Хозяюшка, V2 – Алена, V3 – Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы; XC-94, AC-91, EC-1 – образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы, S1-S4 – изоформы супероксиддисмутазы; **В.** Определение изоформ SOD в листьях картофеля с ингибиторами 3 мМ KCN и 5 мМ H₂O₂, где S1 – изоформа Mn-SOD, S2 – изоформа Fe-SOD.

Изоформа S1, которая не ингибировалась KCN и H₂O₂, отнесена к Mn-SOD. У контрольных и зараженных вирусной инфекцией растений активность изоформ S1 была незначительной, что согласуется с экспериментальными данными по определению активности изоформ SOD при низкотемпературной адаптации и солевом стрессе картофеля (Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N.). Изоформа S2 ингибировалась H₂O₂ и была отнесена к изоформам Fe-SOD. Следует отметить, что активность Fe-SOD у зараженных растений микроклонов была выше по сравнению с контролем, которая проявлялась на геле более интенсивной окраской полос.

Кроме того, у соматклонов картофеля, зараженных вирусной инфекцией, наблюдали появление двух изоформ – S3 и S4. Эти изоформы были отнесены к Cu/Zn-SOD на основании исчезновения белковых полос при высоких концентрациях KCN (3 мМ) или H₂O₂ (5 мМ). Изоформы S3 и S4 проявляли интенсивную окраску на геле, что свидетельствовало об их активности. Из полученных данных по определению изоферментного состава супероксиддисмутаза было установлено, что в результате стрессового воздействия – вирусной инфекции отмечалась активность двух изоформ фермента: Fe – и Cu/Zn-SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования антиоксидантной системы и формирования защитного иммунитета растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате многоплановых исследований были получены результаты, которые имеют как теоретическое, так и практическое значение. На основании результатов были сделаны следующие выводы:

1. На основании комплексных исследований установлено, что процесс каллусогенеза для изучаемых сортов картофеля (Хозяюшка, Алена, Ермак) зависит от типа первичного экспланта, гормонального состава питательной среды и условий культивирования. Показано, что добавление в питательную среду 2,4-Д (5 мг/л) в сочетании с кинетином (0,25 мг/л), приводило к формированию каллусной ткани в 85%–100% случаев из листовых и 48–61% – при использовании стеблевых эксплантов.

2. Разработан протокол получения растений–регенеранов изучаемых сортов картофеля из длительно пассивной каллусной ткани.

3. Установлена вариабельность в содержании крахмала и белка среди соматоклональных образцов картофеля, полученных из каллусной ткани, которые отличались по морфологическим признакам от контрольных образцов. Общее содержание белка и крахмала у соматоклональных образцов превосходило контрольные значения, и самые высокие исследуемые показатели были получены у самоклонов от сорта Хозяюшка (крахмал–25,3%, белок– 3,0 г).

4. Установлено, что инфицирование микроклонов изучаемых сортов картофеля мозаичным вирусом (PVS) приводило к повышению общего уровня активности ферментов пероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы по сравнению с контрольными растениями, за исключением микроклонов, полученных от восприимчивого к вирусам сорта картофеля Ермак.

5. Показано, что инфицирование вирусом PVS микроклонов картофеля приводит к изменению изоферментного спектра пероксидазы: у инфицированных растений выявлено 5–6 изоформ, у контрольной группы – 4–5 изоформ. Отмечены изменения в активности каталазы: у инфицированных растений выявлено 3 изоформы, у контрольной группы – 1 изоформа. Инфицирование растений приводит к изменению изоферментного состава супероксиддисмутазы и появлению двух изоформ: Fe – и Cu/Zn–SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования антиоксидантной системы и защитного иммунитета растений.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные и в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. **Киргизова, И.В.** Ответная реакция микроклонов картофеля (*S. tuberosum L.*) на инфицирование вирусом PVS / **И.В. Киргизова, Е.А. Калашникова** // Вестник ВГУ. Серия «Химия. Биология. Фармация» – 2023. – №. 3 – С.39 – 52.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

2. **Киргизова, И.В.** Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля в условиях биотического и абиотического стресса / **И.В. Киргизова, А.М.**

Гаджимурадова, Р.Т. Омаров // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т.8. – №4 (27). – С. 42 – 54.

3. **Киргизова, И.В.** Физиологические особенности реакции микроклонов картофеля (*S. tuberosum* L.) на заражение вирусом картофеля S / **И. В. Киргизова**, Е. А. Калашникова // Естественные и технические науки. – 2022. – № 8(171). – С. 34 – 38.

4. **Киргизова, И.В.** Морфофизиологическая реакция сортов картофеля (*S. tuberosum* L.) и их соматклонов, полученных *in vitro*, на инфицирование вирусом PVS / **И.В. Киргизова**, Е.А. Калашникова, А.М. Гаджимурадова, Д.В. Силаев, Р.М. Турпанова, С.Б. Жангазин // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2023. – Т.3. – №3. – С 442 – 453.

5. **Kirgizova I.V.** Levels of physiological activity of antioxidant enzymes in potatoes (*S. tuberosum* L.) when infected PVS virus. / **I.V. Kirgizova**, Е.А Kalashnikova, R.M Turpanova, А. М. Gadzhimuradova., D.V. Silaev. // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2023. – Т. 1154. – №. 1. – С. 012033.

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях:

6. **Киргизова, И.В.** Основные фитопатогенные вирусы картофеля, распространенные на территории Западной Сибири / **И.В. Киргизова** // Динамика систем, механизмов и машин. – 2016. – Т. 4. – №. 1. – С. 374-378.

7. **Киргизова, И.В.** Окислительный стресс и антиоксидантные ферменты растений картофеля (*Solanum tuberosum* L.) / **И.В. Киргизова**, А.М. Гаджимурадова // Научные инновации – аграрному производству. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию юбилею Омского ГАУ. –2018. – С. 661 – 665.

8. **Kirgizova, I.V.** The synthesis of antioxidant enzymes in potato plants under biotic and abiotic stress conditions / **I.V. Kirgizova**, А.М. Gajimuradova, R.T. Omarov //11th International conference Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems Biology. – Novosibirsk, 2018. – P. 171. DOI: 10/18699/BGRSSB-2018-142

9. **Киргизова, И. В.** Влияние вирусной инфекции картофеля (*PVY⁰*) и (*PVS⁰*) на биохимические показатели уровней антиоксидантных ферментов у разных генотипов картофеля / **И.В. Киргизова**, А.М. Гаджимурадова // Биотехнология и общество в XXI веке: Сборник статей / Под редакцией М.М. Силантьевой. – Барнаул: Алтайский государственный университет, 2018. – С. 73 – 83.

10. Швидченко В.К. Изучение каллусообразующей способности различных эксплантов картофеля *Solanum tuberosum* L. / В.К. Швидченко, **И.В. Киргизова**, А.М. Гаджимурадова // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. – 2018. – С. 272-273.

11. **Киргизова, И.В.** Влияние вируса картофеля PVS0 как фактора биотического стресса у растений сибирских сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L) на уровень растворимых ферментов пероксидаз/ **И.В. Киргизова**, С.Б.Чачина// Вестник ЕНУ имени Л.Н. Гумилева. Серия биологические науки bulletin of L.N. Gumilyov ENU. – Bioscience Series. – № 3(132). – 2020. – С. 28 – 42.

12. **Киргизова, И.В.** Характеристика соматклонов, полученных при длительном культивировании каллусной ткани картофеля *in vitro* / **И.В. Киргизова**, Е.А. Калашникова, А.М. Гаджимурадова // Всероссийская научная конференция с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» – Иркутск, 2023. – С. 81.

13. **Киргизова, И.В.** Морфофизиологическая реакция сортов картофеля (*S. tuberosum* L.) и их соматклонов, полученных *in vitro* на инфицирование вирусом PVS / **И.В. Киргизова**, Е.А. Калашникова, А.М. Гаджимурадова // Междунар. науч. конф. «Настоящее и будущее биотехнологии растений», (24–26 мая 2023 г), – г. Минск. – С. 123.