

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский государственный аграрный университет –  
МСХА имени К.А. Тимирязева»

*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

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
КАЛАШНИКОВА Елена Анатольевна  
доктор биологических наук, профессор

Москва – 2024

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>2,4 – Д</b>	2,4–дихлорфеноксиуксусная кислота
<b>APX</b>	Аскорбатпероксидаза
<b>BIS акриламид</b>	метилен – бис – акриламид
<b>Cu /Zn – SOD</b>	изоформы супероксиддисмутазы, содержащие медь и цинк
<b>Fe/Mn – SOD</b>	изоформы супероксиддисмутазы, содержащие железо или марганец
<b>GSH</b>	Глутатион
<b>GPX</b>	Глутатионпероксидаза
<b>ICTV</b>	Международный комитет по таксономии вирусов
<b>MS</b>	питательная среда Мурасиге – Скуга
<b>MV</b>	метил–виологен
<b>NBT</b>	нитрозосиний тертразолий
<b>PLRV</b>	вирус скручивания листьев
<b>PMSF</b>	Фенилметилсульфонилфторид
<b>POX</b>	Пероксидаза
<b>PVM</b>	М – вирус картофеля
<b>PVS</b>	S – вирус картофеля
<b>PVS<sup>0</sup></b>	ординарный штамм вируса картофеля Y
<b>PVX</b>	X – вирус картофеля
<b>PVY</b>	Y – вирус картофеля
<b>ROS</b>	активные формы кислорода
<b>SOD</b>	Супероксиддисмутаза
<b>TEMED</b>	Тетраметилэтилендиамин
<b>V1, V2, V3</b>	образцы, экстрагированные из растений картофеля
<b>WT</b>	дикий тип растений
<b>БАП</b>	б– бензиламинопурин
<b>ГМ– растения</b>	генетически модифицированные растения

<b>ГМ– культуры</b>	генетически модифицированные культуры
<b>ИУК</b>	3 – индолилуксусная кислота
<b>ИФА</b>	иммуноферментный анализ
<b>ИХА</b>	иммунохроматографический анализ
<b>Кинетин</b>	6 – фурфуриламинопурин
<b>кЛ</b>	Люкс
<b>ЛПХ</b>	личные подсобные хозяйства
<b>НАДН–дегидрогеназа</b>	НАДН – убихинон – оксидоредуктаза
<b>НАДФ+</b>	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
<b>Нм</b>	Нанометр
<b>НУК</b>	1 – нафтилуксусная кислота
<b>Пиридоксин НСЛ</b>	пиридоксина гидрохлорид
<b>ПС</b>	питательная среда
<b>ПС (К.)</b>	контрольный вариант питательной среды
<b>САТ</b>	Каталаза
<b>Тиамин НСЛ</b>	тиамин мононитрат
<b>ФАО</b>	Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций
<b>ЭДТА</b>	этилендиаминтетрауксусная кислота
<b>ЭПР</b>	эндоплазматический ретикулум
<b>ЭТЦ</b>	электрон – транспортная цепь

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>20</b>
1. Особенности выращивания картофеля ( <i>S.tuberosum</i> L.) в условиях Западно – Сибирского региона.....	20
1.1. Селекционная работа по культуре картофеля ( <i>S.tuberosum</i> L.) в Омской области.....	24
1.2. Соматоклональная изменчивость у растений картофеля при культивировании <i>in vitro</i> и возможности ее применения в селекции.....	28
1.3. Вирус картофеля PVS как фактор стресса у растений картофеля.....	30
1.4. Ответная реакция растений картофеля в нормальных и стрессовых условиях произрастания.....	35
1.5. Молекулы активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений .....	39
1.6. Характеристика фермента супероксиддисмутазы (SOD), ассоциированного с выработкой активных форм кислорода.....	44
1.7. Характеристика фермента каталазы (CAT), ассоциированного с выработкой активных форм кислорода.....	47
1.8. Характеристика ферментов пероксидазы (POX), ассоциированных с выработкой активных форм кислорода.....	48
1.9. Основные места генерации активных форм кислорода (ROS) в растительных клетках.....	52
1.10. Регуляция активности антиоксидантных ферментов у растений.....	54
<b>Глава II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>61</b>
2.1. Объекты исследований.....	61
2.2. Получение каллусной ткани картофеля в условиях <i>in vitro</i> .....	65
2.3. Регенерация растений <i>in vitro</i> .....	67
2.4. Регенерация растения из апикальной меристемы.....	67
2.5. Выращивание растений – регенерантов в почвенных условиях....	68
2.6. Инокуляция растений картофеля ( <i>S. tuberosum</i> L) PVS вирусом...	70
2.7. Диагностика растений картофеля на наличие мозаичных вирусов методом иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографических экспресс–тестов (ИХА).....	71
2.8. Гомогенизация образцов растительного материала картофеля.....	72
2.9. Определение активности антиоксидантных ферментов картофеля.....	72

2.10.	Определение активности антиоксидантных ферментов у растений картофеля <i>in gel</i> .....	74
2.11.	Статистический анализ.....	76
<b>Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....</b>		<b>77</b>
3.1.	Обоснование выбора объектов исследований отечественных перспективных сортов картофеля г.Омск и Омской области.....	77
3.2.	Получение каллусной ткани картофеля из листовых и стеблевых эксплантов в условиях <i>in vitro</i> .....	78
3.3.	Регенерация растений из каллусных культур и получение соматклонов <i>in vitro</i> .....	83
3.4.	Соматклональные варианты картофеля, полученные из каллуса ...	86
3.5.	Инокуляция растений вирусной инфекцией .....	91
3.6.	Определение активности антиоксидантных ферментов картофеля.....	93
3.7.	Определение активности пероксидазы у микроклонов картофеля.....	94
3.8.	Определение активности каталазы у микроклонов картофеля ...	97
3.9.	Определение активности супероксиддисмутазы у микроклонов картофеля .....	100
3.10.	Определение активности пероксидазы <i>in gel</i> .....	100
3.11.	Определение активности каталазы <i>in gel</i> .....	103
3.12.	Определение активности супероксиддисмутазы <i>in gel</i> .....	105
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>		<b>107</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>		<b>109</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЯ.....</b>		<b>145</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**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 В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, С, РР, К и минеральных веществ (FAOSTAT, 2020). Картофель относится к основным сельскохозяйственным культурам универсального использования, которые используются на продовольственные цели и для технической переработки. Согласно статистическим данным автономной организации World Potato Congress за 2020–2021 г Россия входит в список 25–ти мировых лидеров по объемам производства картофеля и находится на 4–том месте (22,395 млн. т) по производству картофеля. Лидирующие позиции занимают такие страны как: Китай (90,321 млн. т), Индия (48,529 млн. т), Украина (22,504 млн. т), США находится на 5–том месте (20,607 млн. т) (World potato congress, 2020).

Однако, несмотря на достаточно большой объем производства картофеля в России, широко используются в промышленном картофелеводстве сорта зарубежной селекции, которые обладают высокой урожайностью, устойчивостью к широкому спектру грибковых и бактериальных заболеваний. Однако, несмотря на ряд положительных характеристик, используемые в промышленном картофелеводстве зарубежные сорта не предназначены для длительного хранения, требовательны к влаге и удобрениям, при отсутствии которых их урожайность и качество урожая резко падает (Киру С. Д., 2017).

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 (Спиридонов, И., 2021).

На территории Западно–Сибирского региона также наблюдается тенденция использования сортов картофеля зарубежной селекции, кроме того, наблюдается постепенная утрата и инфицирование отечественных сортов. Причем, Западно–Сибирский регион относится к зоне с континентальным климатом, где продолжительная зима, поздние весенние и ранние осенние заморозки, короткое жаркое лето. На большей части территории наблюдается неустойчивое увлажнение, где средняя годовая сумма осадков составляет 330 мм, значительная часть которых выпадает летом, преобладают ливневые дожди, также периодически наблюдаются засухи и суховеи (Evans D. A., 1984). В связи с вышеперечисленными климатическими признаками, Омскую область, которая входит в состав Западно–Сибирский региона, достаточно сложно отнести к региону благоприятному для выращивания картофеля, поэтому для выращивания данной культуры в этом регионе требуются сорта картофеля, обладающие хорошей устойчивостью к неблагоприятным климатическим условиям и вредителям, а также продолжительностью хранения. Растения картофеля в ходе онтогенетического цикла подвержены воздействию кратковременных или постоянных стрессовых факторов окружающей среды. К наиболее распространенным стрессовым факторам внешней среды относятся: засоление, загрязнение почв тяжелыми металлами, засуха, вирусные и бактериальные инфекции и др. Вирусные инфекции являются наиболее широко распространенным биотическим стрессом на территории региона, снижающими продуктивность и качество картофеля.

Следует отметить, что рынок Западной Сибири, а в частности Омская область, испытывает дефицит отечественного семенного картофеля, адаптированного к климатическим условиям региона за счет импортного

картофеля. Это происходит, в первую очередь, за счет вырождения сортов, которые поражаются вирусными и бактериальными инфекциями, а также отсутствием обновления семенного материала. 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 (Граф Н., 2014).

Вирусы являются одной из главных причин снижения количества и качества основных стратегически важных сельскохозяйственных культур, в том числе и культуры картофеля не только на территории Западно – сибирского региона, но и по всей России. Одной из главных особенностей фитовирусов является их распространение на обширных территориях по всему миру. Более того – внутриклеточное развитие и быстрое распространение вирусов затрудняет использование химических средств защиты, так как они не обладают достаточной эффективностью.

По данным Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 15 декабря 2014 г. № 501 «Об утверждении Перечня карантинных объектов» утвержден Перечень карантинных объектов, в который включено шесть видов вирусов и виридов растений, распространенных на территории России (Минсельхоз России, 2019). Основными, наиболее вредоносными и широко распространенными в России являются: вирусы: скручивания листьев картофеля, PVY, PVX, PVS, PVM (Рогозина Е.В., 2016; Kreuze J. F., 2020). Следует отметить, что развитие вирусных инфекций на культуре картофеля в течение нескольких генераций, а также инфицирование несколькими вирусами приводит не только к снижению качественных характеристик и урожайности, а также вырождению многих отечественных сортов картофеля. За счет отсутствия обновления семенного материала, на грани полного вырождения находятся многие известные сибирские сорта картофеля, в том числе «Ермак», «Седов» и многие другие сорта картофеля отечественной селекции (Граф Н., 2014; Толмачева И. А., 2001; Демчук И., 2011).

Следует отметить, что рынок Западной Сибири испытывает дефицит отечественного семенного картофеля, адаптированного к климатическим условиям региона. Сорты отечественной селекции составляют около 5% в ЛПХ, а в целом по Омской области не более 10 – 15% (Храмцов Ю., 2020). Одним из широко распространенных фитопатогенов, поражающих культуру картофеля, является PVS вирус. Основными признаками инфицирования вирусом являются: углубление жилок, морщинистость, краевой некроз листьев, крапчатость и жилкование. Урожай картофеля при поражении вирусом снижается до 20%, а при совместном поражении с другими фитовирусами до 50%.

Потери урожая картофеля, вследствие распространения вирусной и патогенной инфекции, в различных регионах мира в денежном эквиваленте исчисляются миллионами долларов, а при влиянии комбинированных стрессовых воздействиях, потери урожая увеличиваются. Так, например, только при распространении фитофтороза у растений картофеля на территории России ежегодные потери урожаев картофеля составляют более 4 млн т., а в периоды эпифитотий фитофтороза потери урожайности достигают 50 – 60%. При распространении вируса PVY потери урожая картофеля в зависимости от региона, сорта и других факторов могут достигать 80% (Макарова С.С., 2017; Dangi J., 2001; Anderson P. K., 2004; Экология : справочник, 2015).

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.

В настоящее время основными действующими моделями по противодействию фитопатогенным инфекциям, являются такие методы, как использование биологических препаратов для предотвращения развития и

распространения вирусов, создание генетически модифицированных культур, использование вакцин на основе ослабленных штаммов вирусов для придания растениям устойчивости к дикому типу вируса, а также семеноводство на безвирусной основе.

Однако при использовании разработок по созданию и применению биологических препаратов для предотвращения вирусной инфекции, данные методы являются весьма дорогостоящими и требуют больших капиталовложений, а также имеют достаточно узкий спектр действий и обладают достаточно краткосрочной активностью.

При помощи методов генетической инженерии созданы ГМ – культуры картофеля, обладающие устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды. Однако в современном обществе сложилось негативное отношение к внедрению и использованию генетически модифицированных растений, несмотря на экономическую выгоду использования ГМ – культур.

При рассмотрении методов создания вакцин на основе ослабленных штаммов для придания растениям устойчивости к дикому типу вируса, можно сделать вывод, что данные процессы являются достаточно трудоемкими и требуют больших затрат времени для изолирования дикого типа вируса и внесения мутаций с целью уменьшения степени вирулентности, что снижает рентабельность для вакцинации растений аттенуированными штаммами (Nishiguchi M., 2011). Согласно данным исследователя R. Hull, в процессе практического применения методов вакцинации на основе ослабленных штаммов существует целый ряд проблем, таких как: снижение урожайности, накопление вирусных частиц в растении, приобретение вирулентности у вирусов путем мутаций, возможность комбинированного инфицирования другими вирусами, интенсивности труда и риска генерирования новых патогенных вирусов путем рекомбинации с другими вирусами (Hull R., 2013).

Использование семеноводства на безвирусной основе для культуры картофеля является своего рода профилактической мерой, однако, вследствие

распространения и накопления вирусной инфекции в почве, а так же за счет действия насекомых–переносчиков, возможно повторное инфицирование оздоровленного материала.

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 соматоклональную изменчивость у регенерантов в зависимости от генетических особенностей сорта.

**Степень проработки темы исследования.** Теоретическим и практическим основам решения задач по изучению механизмов защитных реакций растений в ответ на неблагоприятные стрессовые факторы окружающей среды за счет повышенной аккумуляции ROS и активности

антиоксидантной системы, посвящены многочисленные труды отечественных и зарубежных авторов: Радюкиной Н.Л., Кирилловой Н.В., Грасковой И.А., Полесской, Прадедовой Е.В., Маркина В.О., Синькевич М.С., Аверьянова А.А., Балакиной А.А., Куниной Ю.В., Самуилов В.Д., Аверьянов А.А., Омарова Р.Т., Шестак А.А., Нодельман Е.К., Wang W., Dipayan Sarkar, Dr. Sharifi G., El-Missiry A.M., Dar M. I., Komatsu S., Foyer C.H., Noctor G., Dietz K.J., Mittler R., Sukweenadhi J., Novo E., Parola M., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Shafi A., Vysniauskiene R. и много других ученых.

При решении задач по изучению механизмов влияния биотических стрессовых факторов на активность антиоксидантных ферментов и окислительного стресса у растений, было проведено большое количество научных исследований в области биохимии и биотехнологии, в том числе исследования:

Радюкина Н.Л. «Функционирование антиоксидантной системы дикорастущих видов растений при кратковременном действии стрессоров» (03.01.05), 2015г (Радюкина, Н. Л., 2015).

Бердникова О.С. «Воздействие гипоксии и среды высоких концентраций CO<sub>2</sub> на образование активных форм кислорода в клетках различных по устойчивости растений» (03.01.04), 2016г (Бердникова, О. С., 2016).

Ишеева О.Д. «Ферменты первичной защиты от окислительного стресса у вакуолей клеток растений» (03.01.05), 2010г (Ишеева, О. Д., 2010).

Захаренкова Т.С. «Антагонистические взаимодействия патогенного гриба и растения в инфекционной капле, связанные с активацией кислорода» (03.01.05), 2011г (Захаренкова, Т.С., 2011).

Кириллова Н.В. «Ферменты антиоксидантной системы культивируемых растительных клеток» (03.00.04), 2000г (Кирилова, Н.В. 2000).

Галеева Л.А. «Оценка уровня антиокислительных ферментов и железа, меди, марганца в клетках картофеля, инфицированных *Phytophthora infestans*» (03.00.07), 2009г (Галеева Л.А., 2009).

Несов А.В. Активные формы кислорода в гибели клеток растений (03.01.05), 2013г (Несов А.В., 2013).

Нодельман Е.К. «Применение гена Fe– зависимой супероксиддисмутазы для защиты хлоропластов растений томата и табака от окислительного стресса» (03.01.06), 2013г (Нодельман Е.К., 2013).

Минибаева Ф.В. «Активные формы кислорода и ионная проницаемость плазмалеммы в растительных клетках при стрессе» (03.00.12), 2005г (Минибаева Ф.В., 2005).

Шукурова М.Х. «Рост, микроклубнеобразование и активность ферментов у устойчивых к засолению генотипов картофеля *in vitro*» (03.01.05), 2011 г (Шукурова М.Х., 2011).

Из проведенного анализа научных трудов ученых, следует, что изучение естественных защитных механизмов растений за счет повышенной генерации активных форм кислорода и функционирования антиоксидантных ферментов для снижения негативного последствия получило широкое распространение на модельных растениях, таких как табак (*Nicotiana tabacum* L., *Nicotiana benthamiana* L.), резуховидка Таля (*Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh.) и др., а также трансгенных растениях с измененной экспрессией генов, отвечающих за активацию защитного механизма на воздействие стрессового фактора. Однако, вопрос по изучению влияния биотического стрессового воздействия, а именно картофельного вируса PVS на активность системы антиоксидантных ферментов у генотипов отечественных сортов картофеля разных по устойчивости (восприимчивых, умеренно восприимчивых, умеренно устойчивых и устойчивых) изучены все еще недостаточно.

**Объект исследования** – вирус картофеля S (PVS<sup>0</sup>, DSMZ PV – 0838) – возбудитель заболеваний: морщинистости, крапчатости, краевого некроза листьев, жилкования, общего снижения урожайности (до 20%); микроклоны сибирских сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) Ермак (средняя восприимчивость к вирусам, нуждается в защите), Алена (умеренная восприимчивостью к вирусам PVX, PVY, PVM, умеренная устойчивость к

вирусам PLRV, PVS), Хозяюшка (умеренная восприимчивость к вирусу PVY, умеренная устойчивость к PVL, PVS, PVX, устойчивость к PLRV).

**Предмет исследований** – активность антиоксидантных ферментов у микроклонов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) разных по восприимчивости генотипов, полученных из каллусной ткани, под влиянием стрессового воздействия вирусной инфекции (PVS<sup>0</sup>), уровни пероксидазы (POX), каталазы (CAT), супероксиддисмутазы (SOD).

**Цель диссертации** – 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 ( $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), 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 соматклонов 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

микрклона 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» (**Приложение 1**).

Проведена опытная апробация результатов работы на базе лабораторий «Микрклонального размножения» ЗАО ТПК «Элита–картофель» и ООО «Элита» (г.Омск) (**Приложение 2 и 3**).

#### **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–х 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 PVS<sup>0</sup> 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 Международная научно – техническая конференция «Динамика систем, механизмов и машин» Омск: ОмГТУ, 2016;
- Международная научно – практическая конференция, посвященная 100 – летнему юбилею Омского ГАУ «Научные инновации – аграрному производству» – Омск: Омский ГАУ, 2018;

– XI Международная мультikonференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology – BGRS\SB – 2018» – Новосибирск: ИЦИГ, 2018;

– Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Биотехнология и общество в XXI веке» – Барнаул: АлтГУ, 2018.

– XIII Международная научная конференция «Наука и образование – 2018» – Астана, 2018;

– XI Международная конференция «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» – Минск, 2018;

– X Региональный форум предпринимательства «Свое дело – твой успех» – Омск: Департамент городской экономической политики Администрации города Омска, 2019 (**Приложение 4**);

– Международная конференция «Биологические науки» – Нур–Султан, 2020;

– Международная научная конференция «Настоящее и будущее биотехнологии растений» – Минск, 2023;

– Всероссийская научная конференция с международным участием «Устойчивость растений и микроорганизмов к неблагоприятным факторам среды» – Иркутск, 2023.

Работа отмечена Благодарственным письмом Правительства Омской области и Министерства промышленности, транспорта и инновационных технологий Омской области (январь, 2018г), Благодарственным письмом Администрации г.Омска и Фонда содействия инновациям в рамках выставки «Инновации года» (2019г) (**Приложение 5,6**);

**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 CA(pt)).

**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.

**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.

**Благодарности.** Автор выражает благодарность за возможность проведения экспериментов руководителю «Национального центра биотехнологии» доктору Ph.D, профессору, Академику казахстанской национальной академии естественных наук Раманкулову Е.М., агроному-семеноводу ЗАО ТПК «Элита-картофель» Колясину С.Н., д.т.н., профессору Артюховой С.И.

## Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. Особенности выращивания картофеля (*Solanum tuberosum* L.) в условиях Западно – Сибирского региона

Культура картофеля (*Solanum tuberosum* L.) – универсальная культура, которая получила широкое распространение во всем мире за счет своих ценных хозяйственных свойств: высокой и стабильной урожайности, питательной ценности, большого сортового разнообразия по хозяйственно – ценным признакам: сроками созревания, столовым качествам, устойчивости к болезням и вредителям. Согласно рекомендациям специалистов и биологических особенностей картофеля, возделывание картофеля для получения стабильных урожаев, обуславливаются в его районировании для выращивания согласно почвенно–климатических условий регионов России (Росинформагротех, 2021).

Согласно районированию Западно–Сибирского региона (10), он включает в себя такие административные единицы как: Алтайский край, Кемеровская область, Новосибирская область, Омская область, Республика Алтай, Томская область, Тюменская область и на основании рекомендаций специалистов, согласно почвенно–климатических условий, для каждого региона имеются рекомендуемые для выращивания сорта.

Омская область, входящая в состав Западно–Сибирского региона характеризуется наиболее распространенными аллювиальными засоленными почвами (77%) средней зернистости и менее распространенными черноземами солонцеватыми (23%) и черноземными почвами (1%), мелкой зернистости (Почвы Омской области: справочник.,2022).

Территория Омской области характеризуется континентальным климатом с суровой продолжительной зимой, поздними весенними и ранними осенними заморозками, коротким жарким летом (длится в среднем с 13 мая по 18 сентября). Следует отметить, что на территории области

возможны заморозки в летние месяцы, за исключением июля, также отмечаются резкие месячные колебания температур, причем, следует отметить, что колебания температур могут наблюдаться даже в течение суток. За счет большой удаленности от морей и океанов на формирование климата Омской области значительно влияют физические свойства суши. Летом суша сильно и достаточно быстро нагревается, а в зимний период быстро теряет тепло.

Территория Западной Сибири, отгорожена с запада Уральскими горами, с востока – Восточно–Сибирским плоскогорьем, на открытую с севера и мало защищенную с юга территорию, вторгаются арктические холодные воздушные массы и теплые массы из степей Казахстана. Все это в совокупности приводит к неустойчивости и большой изменчивости метеорологических условий г.Омск и Омской области. Самым жарким месяцем в году на территории Омской области является июль (+18,3<sup>0</sup>), самый холодный месяц в году – январь, (–19,2<sup>0</sup>), годовая амплитуда средних месячных температур 37,5<sup>0</sup> (Коллектив авторов. Советы садоводам, 1979).

Омская область относится к зонам с неустойчивым увлажнением, где средняя годовая сумма осадков составляет 330 мм, значительная часть которых выпадает летом, причем, преобладают ливневые дожди, а также периодически наблюдаются засухи и суховеи (Погода и климат: справочник, 2022).

В связи с вышеперечисленными климатическими признаками Омскую область достаточно сложно отнести к региону благоприятному для выращивания картофеля, поэтому для посадки в этом регионе требуются только специальные сорта, которые обладают хорошей устойчивостью к неблагоприятным погодным и почвенным условиям, а также вредителям.

Следует отметить, что рынок Западной Сибири, а, в частности Омская область, испытывает дефицит отечественного семенного картофеля, за счет вырождения вирусными и бактериальными инфекциями. Сорта

отечественной селекции составляют около 5% в ЛПХ, а в целом по Омской области составляют не более 10–15% (Чекусов М., 2019). Общей тенденцией многих хозяйств г.Омска и Омской области является переход на усиленную посадку сортов иностранной селекции картофеля в общем объеме посадочного материала. Так, например, по данным к.с–х.н., зав. отделом картофеля ФГБНУ «Омского аграрного научного центра» А. И. Черемисина, перспективный востребованный населением сорт картофеля Ермак, который получил признание не только на территории Омской области, но и по всему миру, находится на грани полного исчезновения вследствие вирусного вырождения (Граф Н., 2014).

По данным крупного семеноводческого хозяйства Омской области ООО ТПК «Элита картофель» в промышленном производстве картофеля также практически отсутствуют отечественные сорта картофеля, в том числе известный сорт Алена. Данный сорт выведен специалистами ФГБНУ «Омский АНЦ» (СибНИИСХ) (г.Омск) для континентального климата региона и обладает полевой устойчивостью к комплексу вирусных, грибных и бактериальных болезней, распространенных в Сибири (Официальный сайт ООО ТПК «Элита – картофель», 2022).

Использование зарубежных сортов картофеля предопределило зависимость отечественных картофелеводческих хозяйств от импорта исходного генетического материала. 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.

На территории г.Омска и Омской области реализуется «Федеральная научно–техническая программа развития сельского хозяйства Российской Федерации на 2017–2025 годы», где участником программы является

ведущий в регионе селекционный центр – ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», в задачи которого входит «Создание новых сортов картофеля, адаптированных к условиям Западной Сибири, отработка технологического процесса по ускоренному размножению и внедрению в производство». Итогами научно – технического проекта должно стать внедрение сортов отечественной селекции и доведение объемов производства отечественного картофеля до 70–80% (Черемисин А., 2018).

Согласно статистическим данным Министерства сельского хозяйства и продовольствия Омской области по итогам 2020 г. на территории Омской области отмечается недостаточное самообеспечение культурой картофеля – 84,9%, в 2021г. – около 88% при производстве картофеля 266,8 тыс.тонн (Министерство сельского хозяйства и продовольствия Омской области: официальный сайт, 2022).

Таким образом, анализируя литературные данные многолетнего опыта работы омских селекционеров следует отметить, что для континентального климата Омского региона необходимо использовать сорта картофеля, на основании хозяйственно – ценных признаков таких как: высокая стабильная продуктивность в резко изменчивых климатических условиях региона; толерантность к неблагоприятным абиотическим факторам (засухе, недостатку влаги, тяжелым по механическому составу почвам, нередко характеризующимся повышенным содержанием солей); устойчивостью к наиболее распространенным и вредоносным грибным (фитофтороз, альтернариоз, ризоктониоз, фомоз, парша обыкновенная), бактериальным (черная ножка, кольцевая гниль) и вирусным (PVY, PVX, PVS, PVL, PVM) болезням картофеля; высокими товарными качествами (форма клубней, мелкие и поверхностные глазки); хорошими столовыми качествами и содержанием крахмала.

Для агропромышленного комплекса Омской области представляется перспективным вовлечение отечественных сибирских сортов картофеля, как высокоурожайных и устойчивых к климатическим особенностям региона, в

селекционный процесс. Получение новых отечественных сортов картофеля с повышенным содержанием крахмала, обладающих устойчивостью к вирусным инфекциям картофеля для выращивания в условиях Западно–Сибирского региона, позволит обеспечить сочетание высокой урожайности этой важной сельскохозяйственной культуры с более длительным периодом хранения клубней.

Анализ современных научных источников литературы показал, что наиболее эффективным методом селекции при получении новых линий картофеля (*S. tuberosum* L.), может выступать спонтанный мутагенез (Каерплер S.M., 2000; Hussain M., 2021). Появление «соматических» мутаций может быть вызвано активацией транспозонов, вызывающих изменение экспрессии собственных генов растения, появлением точечных мутаций. Использование таких клеток и тканей в культуре *in vitro* позволяет получать новые линии растений, характеризующихся новыми хозяйственно–ценными признаками и значительно сократить сроки селекционного процесса.

### **1.1. Селекционная работа по культуре картофеля (*S. tuberosum* L.) в Омской области**

Согласно рекомендациям сибирских селекционеров и биологических особенностей картофеля их возделывание для получения стабильных урожаев, согласно почвенно–климатических условий Западно–Сибирского региона, необходимо принимать во внимание скороспелость сорта, устойчивость к низкой температуре и повышенной влажности.

Главными приоритетными направлениями селекционных работ в Омской области являются направления по созданию адаптированных к региональным условиям и применяемым технологиям возделывания столовых сортов картофеля, которые должны обладать стабильным и высоким урожаем, обладать хорошими столовыми и товарными качествами и

конкурировать по хозяйственно–ценным признакам с используемыми сортами зарубежной селекции.

Кроме того, немаловажное внимание уделяется устойчивости сортов отечественной селекции к биотическим стрессовым факторам, наиболее распространенными среди которых являются – вирусные и бактериальные инфекции. Согласно данным ФГБНУ «Омского аграрного научного центра» на территории г. Омска и Омской области широко распространены такие бактериальные инфекции как альтернариоз, фитофтороз, ризоктониоз, парша обыкновенная и мозаичные вирусы картофеля – PVY, PVX, PVS, PVM (Черемисин А. И., 2008; Мякишева Е. П., 2016). Еще одним важным направлением селекционных работ для Омской области является выведение сортов картофеля ранней и среднеранней групп спелости, вследствие сравнительно короткого лета.

На основании Государственного реестра селекционных достижений, допущенных к использованию на территории Западно–Сибирского региона, предлагается использовать для посадки ранние, среднеранние, среднеспелые, среднепоздние сорта картофеля. Рекомендуемые для выращивания сорта картофеля на территории Западно–Сибирского региона (10) представлены достаточно большим разнообразием сортов, среди которых **ранние сорта:** Алена, Антонина, Ароза, Барон, Весна, Ермак улучшенный, Жуковский ранний, Каратоп, Красноярский ранний, Лидер, Любава, Приобский, Пушкинец, Ред скарлетт, Фреско, Юбиляр; **среднеранние сорта:** Адретта, Зекура, Кузнечанка, Лина, Нарымка, Невский, Памяти Рогачёва, Рождественский, Сантэ, Сафо, Свитанок киевский, Сентябрь, Томич; **среднеспелые сорта:** Кетский, Лазарь, Луговской, Малахит, Накра, Наяда, Очарование, Солнечный, Стемлук, Тулеевский, Удалец, Хозяюшка **среднепоздние сорта:** Гибридный ВК – 1, Никулинский (Анисимов Б.В., 2013).

Несмотря на достаточно большое разнообразие сортов отечественной селекции, обладающих всеми необходимыми характеристиками и

рекомендованными для выращивания в условиях сурового климата региона, практически все сорта сибирской селекции используются для посадки только на личных подсобных хозяйствах, а в промышленных производствах семенного картофеля используются сорта зарубежной селекции (Федоренко В.Ф., 2018). 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 семенного материала наблюдается снижение качественных показателей картофеля и достаточно большие экономические потери. Так, по мнению руководителя СПК «Пушкинский» (Омская обл.) В. Вальтера для экономического развития региона, существует необходимость использования отечественных разработок селекционеров: «Однако востребованные в России немецкие сорта – Гала и Розара – через несколько лет начинают вести себя одинаково и сводить на нет урожай внезапно проявляющимся бактериозом, наличие собственных разработок семенного материала даст уверенность в качестве продукта». Кроме того, следует отметить, что поставки зарубежного семенного картофеля в регион, являются достаточно дорогостоящими, а также в условиях санкционной политики – могут угрожать продовольственной безопасности (Артюхова С. И., 2015).

Значительная часть импортного семенного картофеля поставляется в Российскую Федерацию через дочерние предприятия иностранных семеноводческих компаний, таких как: «Самара – Солана», «НорикаСлавия», «Агрико–Евразия», «HZPC–Sadokas», «РосЕвроплант» и др., для размножения элитного и репродукционного семенного материала, и последующей его реализации российским производителям (Журавлева Е.В., 2018).

Согласно данным Федеральной службы государственной статистики Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за 2018 г. доля высеянных семян картофеля иностранной селекции в Российской Федерации

составила – 54,8%, а в Сибирском федеральном округе, в состав которого входит Омская область – более 27% (Правительство РФ. ФНТП, 2021, Полухин А.А., 2020). При этом сортовые ресурсы Сибирского федерального округа (СФО) на культуру картофеля по количеству селекционных достижений в Государственном реестре за 2019 г. составляли – 61 сорт, из них 15 сортов иностранной селекции, что составило – 25% (Росинформагротех, 2019).

Несмотря на то, что рынок Омского региона по-прежнему испытывает дефицит отечественного картофеля, сибирские сорта картофеля пользуются большим потребительским спросом у населения. На основании проведенных маркетинговых исследований г. Омска и Омской области среди разных возрастных и социальных групп наиболее известными и востребованными среди населения оказались сорта Ермак, Алена и Хозяюшка, как наиболее высокоурожайные и перспективные сорта с отличными вкусовыми качествами, а также обладающие устойчивостью к комплексу грибных, бактериальных и вирусных инфекций.

В связи с вышеизложенным, актуальным является наличие разнообразного исходный материала с генетической основой для создания собственных сортов отечественной селекции с улучшенными хозяйственно – ценными признакам и для климатических особенностей Западно – Сибирского региона.

Сибирские сорта картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка были выбраны нами в качестве объектов для проведения работ по индукции каллусной ткани с целью соматклональной изменчивости и получения новых ценных сортовых признаков картофеля, а также изучения механизмов физиологического ответа микроклонов на заражение картофельным вирусом PVS, как наиболее распространенным и вредоносным, для получения соматклональных образцов и возможности проведения дальнейших селекционных работ по разработке новых комплексно устойчивых сортов картофеля.

## **1.2. Соматоклональная изменчивость у растений картофеля при культивировании *in vitro* и возможности ее применения в селекции**

В условиях сложной политической ситуации и введения санкций, разработка новых комплексно устойчивых отечественных сортов картофеля становится одним из приоритетных направлений селекционных работ в регионе. Следует отметить, что для получения новых сортов и придания улучшенных качественных характеристик картофеля, наиболее эффективным способом является сочетание традиционных методов и современных методов биотехнологии, которые позволяют значительно сократить сроки проведения работ.

Главными проблемами отрасли картофельного семеноводства в регионе являются такие факторы как: отсутствие нормативно–правовой базы, необходимость доработки ГОСТов на семенной и товарный картофель, необходимость в обучающих программах и курсах для производителей и хозяйств, а также отсутствие диагностики скрытых вирусных и бактериальных инфекций.

В связи с этим для сельского хозяйства региона представляется актуальным и перспективным вовлечение отечественных сортов картофеля, обладающих необходимыми хозяйственно–ценными признаками и устойчивостью к фитовирусам и бактериальным инфекциям, в селекционный процесс для получения разнообразного генетического материала.

В настоящее время перспективными способами повышения эффективности селекционного процесса является использование современных методов биотехнологии, которые позволяют расширить спектр генетического разнообразия (соматоклональная вариабельность, соматическая гибридизация и др.) и в значительной степени сократить сроки проведения селекционного процесса (Калашникова Е. А., 2003).

Генетическая гетерогенность культивируемой ткани в условиях *in vitro* имеет положительное значение для проведения селекционного процесса, так как она повышает адаптивные возможности культивируемой ткани. В культуре происходит спонтанный отбор полиплоидных клеток, которые быстрее приспособляются к новым условиям культивирования и стрессовым факторам окружающей среды. Варибельность среди клеточных линий или полученных растений–регенерантов называют соматклональной изменчивостью. Главным фактором, оказывающим влияние на соматклональную изменчивость у картофеля, являются условия регенерации растений, среди которых немаловажное значение имеет питательная среда для культивирования и входящие в ее состав фитогормоны. Выступающие в качестве объектов соматклональной изменчивости каллусные ткани картофеля в условиях *in vitro* лишены тонкой сбалансированной регуляции, присущей целостному растению, в связи с этим на стабильность и изменчивость каллусной культуры картофеля оказывает влияние длительность пребывания каллусной ткани в стадии неорганизованного роста (Калашникова Е. А., 2020), выбор первичного экспланта и гормонального состава питательной среды.

Типы морфогенеза, такие как соматический эмбриогенез или органогенез, регулируемые главным образом геномом и содержанием экзогенных фитогормонов в питательной среде, могут неодинаково сказываться на геноме растений и приводить к изменениям, которые проявляются на фенотипе растений. В настоящее время успехи в индукции разных форм растений при использовании методов культуры *in vitro* достигнуты с вегетативно размножаемыми растениями, которые обладают важными хозяйственно–ценными наследуемыми признаками и могут быть быстро размноженными. Согласно опубликованным научным данным, наиболее эффективным методом селекции при получении новых линий картофеля (*S. tuberosum* L.), может выступать спонтанный мутагенез (Каерплер S. М., 2000). Появление «соматических» мутаций может быть

вызвано активацией транспозонов, вызывающих изменение экспрессии собственных генов растения, появлением точечных мутаций. Использование таких клеток и тканей в культуре *in vitro* дает возможность исследователям получать новые варианты растений, характеризующихся новыми хозяйственно–ценными признаками (Hussain M., 2021).

Следует отметить, что важным признаком для картофеля является содержание крахмала, который содержится в клубнях картофеля и оказывает непосредственное влияние на хранение и лежкость, а также на качественные показатели картофеля. Содержание крахмала зависит от скороспелости сортов, поэтому позднеспелые сорта характеризуются максимальными значениями по этому показателю. В процессе хранения количество крахмала в клубнях уменьшается в результате гидролитического распада его до сахаров. Перспективным направлением селекционной работы Сибирского региона является увеличение содержания крахмала и белка в клубнях картофеля для увеличения сроков хранения картофеля, в связи с необходимостью длительного хранения картофеля и увеличением их питательных свойств, а также устойчивости к вирусным заболеваниям.

В связи с этим, получение соматоклональных вариантов от сибирских сортов картофеля с применением культуры *in vitro* и их оценка по таким хозяйственно – ценным признакам, как содержание крахмала и белка, активности физиологического ответа при инфицировании мозаичными вирусами, является актуальным и перспективным и представляет практический интерес для Западно – Сибирского региона и Омской области.

### **1.3. Вирус картофеля PVS как фактор стресса у растений картофеля**

Растения картофеля относится к культурам, которые сильно подвержены инфицированию вирусами (Baxter A., 2013; Mittler R., 2011; Shah J.,2013). Одним из главных ограничивающих факторов развития промышленного картофелеводства Западно–Сибирского региона являются вирусные и бактериальные инфекции. Причем, следует отметить, что в настоящее время,

количество и регионы распространения вирусных болезней картофеля существенно увеличивается за счет расширения круга хозяев у вирусов и определения новых ранее неизвестных вирусов или их более опасных штаммов (Visser J. C., 2012; Lambert S. J., 2012).

Основными причинами увеличения распространения вирусов, которые поражают картофель, являются расселение переносчиков инфекции, в особенности тлей и «супер–векторов», таких как *Bemisia tabaci* и *Frankliniella occidentalis*, изменение климатических условий, недостаточный контроль скрытой вирусной инфекции у импортируемого семенного картофеля, отсутствие обновления посадочного материала картофеля.

Согласно исследованиям Рогозиной Е.В. и Мироненко Н.В., активизация торговых отношений и поставка зарубежной сельскохозяйственной продукции картофеля приводят к появлению в защищенном грунте северных стран, таких как Россия, Финляндия и др., фитовирусов, которые являются типичными представителями тропической и субтропической зоны (Рогозина Е. В., 2016).

Наиболее распространенными и вредоносными на территории Российской Федерации являются пять вирусов: вирус скручивания листьев картофеля (Potato leaf roll virus, PLRV), Y вирус картофеля (Potato virus Y, PVY), X вирус картофеля (Potato virus X, PVX), S вирус картофеля (Potato virus S, PVS), M вирус картофеля (Potato virus M, PVM) (Рогозина Е.В., 2019). Несмотря на широкое распространение вирусных инфекций и многочисленных трудов исследователей, в настоящее время имеются достаточно ограниченные сведения о физиологических реакциях у микроклонов картофеля, полученных путем длительно культивируемой каллусной ткани в ответ на заражение вирусной инфекцией, что открывает возможность углубленного понимания физиологических реакций картофеля в ответ на воздействие вирусной инфекции (Киргизова И. В., 2018).

Одним из наименее изученных и повсеместно распространенных вирусов, поражающих культуру картофеля, является PVS вирус (Kogovsek P.,

2013). Вирус PVS, который широко распространен на территории г. Омска и Омской области, имеет мировое распространение и встречается практически во всех регионах, в которых возделывается культура картофеля. При инфицировании растений разных сортов картофеля симптомы вирусной инфекции морфологически практически не проявляются (Ruiz-Sáenz D. R., 2019).

Вирус PVS относится к семейству *Betaflexiviridae*, подсемейству *Quinvirinae* Q, роду *Carlavirus*. Вирионы данного вируса содержат одну молекулу линейной одноцепочечной РНК размером около 5,9 – 9,0 т.п.н. Вирусная РНК закрыта (или, вероятно, закрыта) на 5' конце с помощью m<sup>7</sup>G и имеет полиаденилированный тракт на 3' конце (Margaritopoulos, J. T., 2015).

Представители рода *Carlavirus* имеют слегка изогнутые нитевидные частицы длиной около 610 – 700 нм и диаметром 12 – 15 нм (рис.1).

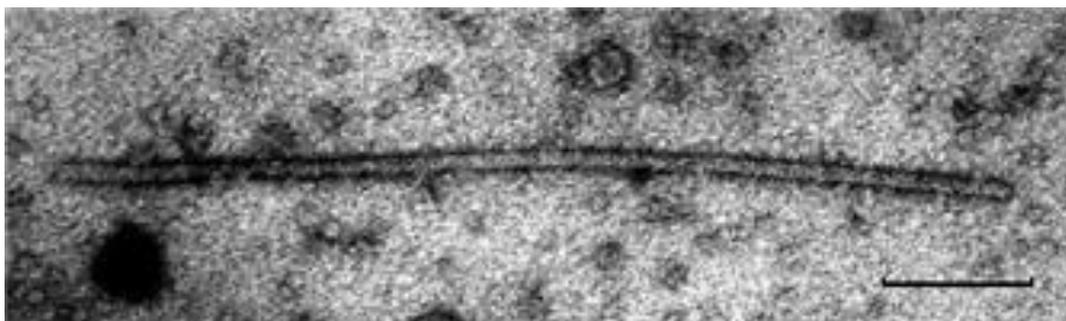


Рисунок 1. Электронные микрофотографии вирусной частицы PVS (шкала – 100 нм) (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019).

Существует предположение о том, что структура вирусов рода *Carlavirus*, вероятно, аналогична структуре *Potexviruses*. *Carlavirus* либо тесно, либо отдаленно связаны друг с другом, и эти отношения подтверждены филогенетическим анализом вирусных белков (Hull R., 2013).

В настоящее время считается, что признанными являются два штамма вируса PVS: обычный (PVS<sup>0</sup>) и штамм Andean (PVS<sup>A</sup>) (Thresh J.M. 1989). Штамм Andean (PVS<sup>A</sup>), в отличие от более широко распространенного штамма вируса PVS<sup>0</sup>, вызывает более серьезное поражение растений картофеля, приводящее к преждевременному отмиранию листьев.

Классификация штаммов вируса основывалась исследователями на способности инфицировать травянистые растения киноа (*Chenopodium quinoa*) в ходе механической инокуляции. Несмотря на то, что штамм PVS<sup>A</sup> обладает способностью заражать растения киноа, а штамм PVS<sup>0</sup> индуцирует более серьезное поражение, приводящее к преждевременному отмиранию листьев (Рис. 2).



Рисунок 2. Симптомы PVS вируса на листьях картофеля *S. tuberosum* L. (Weidemann H. L., 1986)

Штаммы вируса PVS<sup>A</sup> первоначально были открыты в Южной Америке, однако позднее изоляты вируса были впоследствии обнаружены и описаны в других странах: Нидерландах, США, Новой Зеландии, Великобритании и Германии. В настоящее время на территории Колумбии обнаружен новый изолят вируса PVS, поражающий картофель (Gutierrez P. A., 2013). Ученые предполагают, что новые изоляты вируса PVS образуются в результате рекомбинации между штаммами PVS<sup>A</sup> и PVS<sup>0</sup> (Sousa G. D. P., 2012).

Согласно последним данным по влиянию на выход клубневого материала картофеля, вызванного инфицированием PVS вирусом картофеля, было установлено, что процент урожайности снижается до 20%, а при совместном поражении с другими фитовирусами такими как, PVS + PVM и PVS + PVX процент урожайности снижается до 30% и более (Wang, B.,

2011). На рисунке 3 представлены растения картофеля, инфицированные одновременно четырьмя вирусами картофеля PVM, PVS, PVX и PVY.



Рисунок 3. Картофель, одновременно инфицированный четырьмя вирусами PVM, PVS, PVX и PVY (Daurov D., 2020)

Совместное заражение несколькими вирусами картофеля негативно сказывается на физиологических и биохимических процессах. Растения отстают в росте, а также дают значительно меньший урожай в среднем до 48,8 – 54,9% (El-Dougdoug K. A., 2014).

Типичными признаками заражения вирусной инфекцией одним вирусом PVS, является углубление жилок, морщинистость, крапчатость, некоторые сорта картофеля реагируют краевым некрозом листьев и жилкованием (Келдыш М. А., 2003). Распространение вирусных частиц в основном осуществляется посредством контакта между здоровыми и пораженными растениями, стеблевыми или клубневыми прививками, а также переносчиками (Зыкин А. Г., 1976). Вирус PVS является наиболее широко распространенным биотическим стрессором на территории региона и за счет своего внутриклеточного развития является потенциально опасным за счет малой эффективности применения химических средств защиты при обработке растений картофеля.

#### 1.4. Ответная реакция растений картофеля на стрессовые условия произрастания

В ответ на негативное влияние факторов окружающей среды, в том числе и заражения вирусами, растения в ходе эволюции выработали естественный механизм защиты, который основан на повышении активных форм кислорода (ROS) (Muhammad A. F., 2019). У растений в нормальных условиях синтезируются молекулы активных форм кислорода в процессе фотодыхания, такие как перекись водорода, супероксидный анион–радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ) и синглетный кислород ( $^1O^2$ ). Данные молекулы образуются постоянно и являются необходимыми для обезвреживания патогенов, синтеза лигнина, запуска процессов старения, передачи сигналов, метаболизма фитогормонов и других физиологических реакций в клетках растений.

В настоящее время установлено, что в нормальных условиях роста концентрация кислорода в митохондриях клеток животных достигает 0,1 мкМ, в то время как в митохондриях растительных клеток концентрация достигает более 250 мкМ (Гарифзянов А. Р., 2011), поэтому митохондрии в клетках растений могут служить источником АФК, который образуется также в хлоропластах, например, молекулы  $^1O^2$  образуются в процессе взаимодействия хлорофилла, возбужденного квантом света в триплетном состоянии, и молекулярного кислорода.

Необходимая для перехода энергия, составляет около 22 ккал/моль, однако, при поглощении избыточной энергии и происходит обращение спина одного электрона а затем и формирование синглетного кислорода (Asada, K., 1999), формирование молекул супероксидного анион–радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ) осуществляется в фотосистемах I и II хлоропластов, а также в митохондриях (Yamane Y., 1998). В фотосистеме I появление супероксидного радикала осуществляется в процессе реакции Мёллера и связано с работой 4Fe – 4S–кластеров, ферредоксина и/или ферредоксин – НАДФН–редуктазы (Palatnik

J. F., 1999). Генерация анион–радикала, кроме того, возможна на уровне реакционного центра ФС II. В митохондриях растений образование  $O_2^{\cdot-}$  связано с процессами дыхательной электрон–транспортной цепи во внутренней митохондриальной мембране и захватом молекулярным кислородом электронов с гемов (b1 и b2) и семихинонов (Полесская О. Г., 2007).

Согласно оценкам некоторых исследователей, в оптимальных условиях произрастания растений около 2 – 5% проходящих по ЭТЦ электронов идут на формирование супероксидных радикалов (Brand M. D., 2004; Meller I. M., 2004; Smirnoff N., 2003).

Активные формы кислорода выступают в качестве сигнальных молекул в растительном организме, и в зависимости от уровней активных форм кислорода у растения определяется тип клеточного ответа на действия стрессора (Nakabayashi R., 2014; Gechev T. S., 2006). При нормальных условиях роста в клетках растений образуются активные формы кислорода в результате процессов фотодыхания и фотосинтеза, которые участвуют в передаче сигналов и первичном раннем иммунном ответе растений на воздействие стрессоров, в процессах лигнификации клеточных стенок, и участвуют в процессах старения клеток (Grob F., 2013; Максимов И. В., 2006; Mittlerer R., 2002). Сообщается также об участии супероксидного анион – радикала в растяжении листовых пластинок у растений (Jimenez – Del– Rio, M., 2012; Колупаев Ю. Е., 2007).

В настоящее время известно, что при различных воздействиях окружающей среды, таких как абиотические факторы, к которым относят тепловые стрессы (Lu P., 2008), загрязнение почвы тяжелыми металлами (Chen T.F ., 2008), засоление почв (Hernandez J. A., 2000; Benevides M. P., 2000), УФ–облучение, засуха и другие факторы, и при воздействии биотических стрессоров окружающей среды, таких как патогены, которые активируют ферменты, продуцирующие ROS (например, НАДФН–оксидазу, пероксидазы клеточной стенки), и приводят к накоплению клеточных или

межклеточных ROS, таких как супероксид или пероксид водорода (Wang W., 2016; Pogany M., 2009) (рис. 4).

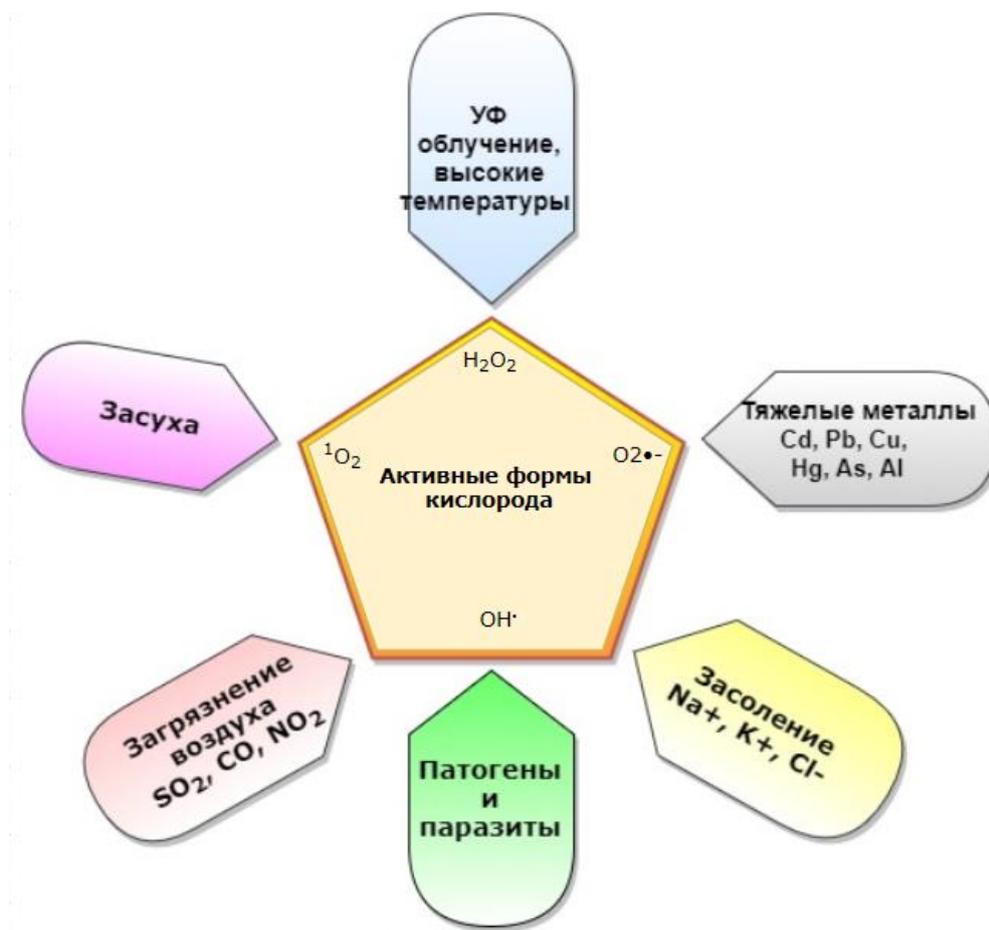


Рисунок 4. Факторы, влияющие на образование молекул активных форм кислорода (ROS)

Биологический эффект действия данных молекул ROS зависит от уровня их аккумуляции. При произрастании растений в нормальных условиях, без воздействия стрессора, концентрация молекул активных форм кислорода достаточно невелика и составляет, примерно, для молекул  $H_2O_2$  –  $10M^{-8}$ , анион–радикала – порядка  $10M^{-11}$ , а для  $HO^{\bullet}$  меньше  $10M^{11}$  (Ogawa K, 1996). Низкие концентрации молекул ROS непосредственно участвуют в протекании таких физиологических и адаптивных реакций растений. Пролиферация и дифференциация клеток, регуляция окислительно–восстановительных реакций. Данные молекулы принимают участие в многочисленных физиологических процессах развития и регуляции у

растений, действуя как сигнальные молекулы (Correa–Aragunde N., 2015), и в клеточных процессах: митоз, тропизм и апоптоз.

Активность данных молекул имеет значение не только для развития растений, но и для защиты от стрессовых факторов окружающей среды (Dar M. I., 2017; Ishikawa T., 2013). Так, например, молекулы  $H_2O_2$  за счет своей способности проникать через клеточные мембраны и относительно высокой стабильности в клетках участвуют в распространении ROS– опосредованного ответа (Khan A.U., 1995). Накопление молекул  $H_2O_2$  у растений играет немаловажную роль и в развитии устойчивости растений к вирусной инфекции. Повышение уровня ROS может непосредственно угнетать распространение патогенов посредством деградации их белков, нуклеиновых кислот, воздействуя на мембраны и путем ингибирования прорастания спор инфекционных возбудителей (Minibayeva F., 2015).

В клетках и тканях растений постоянно поддерживаются баланс образования и разрушения молекул активных форм кислорода. При произрастании растений в нормальных условиях окружающей среды молекулы активных форм кислорода не способны причинить какой–либо вред растениям, так как они постоянно инактивируются с помощью ряда антиокислительных механизмов (Foyer C. H., 2005; Dietz, K. J., 2016).

Однако при воздействии стрессовых условий среды, уровни ROS могут значительно повышаться, что ведет к образованию и накоплению радикалов  $O_2$ , OH, NO, которые могут приводить к повреждениям клеточных структур растений (белки, липиды, нуклеиновые кислоты). В большинстве случаев, наиболее потенциально опасным эффектом накопления ROS является то, что при высоких концентрациях они вызывают генетически запрограммированную гибель клеток – апоптоз (рис. 5) (Foyer C. H., 2005).



Рисунок 5. Влияние абиотических и биотических стрессовых факторов окружающей среды на повышение уровней активных форм кислорода, приводящих к повреждениям биомолекул

Влияние молекул активных форм кислорода на клетки растений зависят от их количества и локализации в растительных клетках. Умеренная генерация данных молекул может активировать процессы естественных защитных механизмов (синтез стрессовых белков, ферментов антиоксидантной системы), более сильная генерация ROS способна индуцировать программируемую клеточную гибель.

### 1.5. Молекулы активных форм кислорода и антиоксидантные ферменты растений

Активные формы кислорода являются необычайно реакционноспособными молекулами и при высоких концентрациях могут

оказывать токсичный эффект на клетки и ткани растения, приводя к изменению клеточного метаболизма посредством окислительного повреждения мембран, белков и нуклеиновых кислот (Mlay J.A., 2003; Miller G. A., 2010; Giraud E., 2008).

К активным формам кислорода относят радикалы, которые образуются в результате отщепления или присоединения электронов к молекуле кислорода. Отщепление одного электрона у молекулы кислорода приводит к образованию супероксид катиону радикала  $O_2^+$ , а присоединение электрона к образованию супероксид аниона  $O_2^-$ . Далее, присоединение еще одного дополнительного электрона ведет к образованию пероксида иона  $O_2^{2-}$ , который образует пероксид водорода  $H_2O_2$  путем протонирования ионами водорода. Затем  $H_2O_2$  разлагается на гидроксид радикал  $OH\cdot$  в присутствии ионов одновалентной меди и двухвалентного железа (табл. 1).

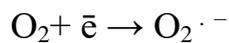
Таблица 1

Молекулы ROS, приводящие к «окислительному стрессу»

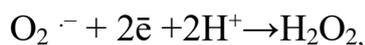
Активные формы кислорода (ROS)	Источники	Способ активации	Реакция с белками	Антиоксидантная система
Супероксид анион $O_2^-$	Мембраны, Хлоропласты, Митохондрии	Реагируют с двойными связями	С Fe-центрами	Супероксид-дисмутаза (SOD)
Гидроксильный радикал $OH\cdot$	Мембраны, Хлоропласты, Митохондрии	Чрезвычайно реакционноспособны со всеми биомолекулами	Быстрые реакции	Флавоноиды и пролин
Перекись водорода $H_2O_2$	Мембраны Хлоропласты, Митохондрии Пероксисомы	Окисляют белки и образуют $OH\cdot$ через $O_2^-$	Воздействие на остатки цистеина	Каталаза (CAT), Флавоноиды
Синглетный кислород $^1O_2$	Мембраны Хлоропласты, Митохондрии	Окисляет белки полиненасыщенных жирных кислот и ДНК	Воздействие на трипсин, метионин, цистеин, тирозин	Каротиноиды и $\alpha$ -токоферол

Супероксидный радикал  $O_2^-$  представляет собой частицу, которая несет неспаренный электрон на внешней стороне орбитали и обладает высокой

химической активностью. Супероксидный радикал формируется в результате реакции неполного восстановления молекулы кислорода с образованием аниона кислорода:



Супероксидный радикал  $\text{O}_2 \cdot^-$  не может проникнуть сквозь мембрану и становится источником других форм АФК. Перекисное соединение  $\text{H}_2\text{O}_2$  образуется в результате получения супероксидным радикалом дополнительного электрона:



Гидроксил радикал ( $\text{OH}\cdot$ ) формируется из  $\text{H}_2\text{O}_2$  путем восстановления дополнительным электроном:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \bar{e} + \text{H}^+ \rightarrow \text{OH}\cdot$

Гидроксил радикал является активным и достаточно агрессивным соединением, которое окисляет любые вещества клетки.

В естественных условиях произрастания у растений, под влиянием окружающих факторов, равновесие между уровнем активных форм кислорода и антиоксидантными компонентами нарушается (Gill S.S., 2010). При перокисном окислении липидов мембран, активные формы кислорода вступают в реакцию с полиненасыщенными жирными кислотами, которые входят в состав фосфолипидов мембран, что приводит к нарушению функций органелл (Hussain S., 2019). Для того чтобы предотвратить повреждение клеточных компонентов от молекул активных форм кислорода, растения разработали сложную антиоксидантную систему защиты, которая позволяет растениям адаптироваться к различным стрессовым факторам окружающей среды (Bowler C., 1992; Yu Q., 1998; Khalid F., 2016; Ara N. 2013). Основные компоненты антиоксидантной системы растительных клеток и тканей представлены неферментативной частью: каротиноиды, аскорбаты, глутатионы и токоферолы, аскорбиновая кислота и другие, а также ферментативной частью: супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPX), пероксидазы (POX), аскорбатпероксидазы (APX) (табл.2) (Foyer C. H., 1976; Novo E., 2008; Gill S. S., 2010; Miller G. A., 2010; Khan M. I., 2014; Khan M. I. R., 2015; Khan M. I. R., 2016).

## Основные неферментные компоненты антиоксидантной системы растений

Неферментные антиоксиданты	Функции	Локализация
Аскорбиновая кислота (АА)	Детоксикация $H_2O_2$ за счет аскорбатпероксидазы (АРХ)	Цитозоплазма, хлоропласт, митохондрия, пероксисомы, вакуоли и апопласты
Глутатион (GSH)	Субстрат для детоксикации ферментов пероксидазы (РЕХ), глутатион редуктазы (GR).	Цитозоплазма, хлоропласт, митохондрия, пероксисомы, вакуоли и апопласты
$\alpha$ – Токоферол	Детоксикация продуктов перокисного окисления липидов мембран (LPO)	Мембраны
Каратиноиды	Подавление избыточной энергии от светособирающих комплексов	Хлоропласты и другие хромопласты, лейкопласты
Флавоноиды	Прямое поглощение $H_2O_2$ и $^1O_2$ , $OH\cdot$	Вакуоли
Пролин	Эффективное поглощение $OH\cdot$ , $^1O_2$ , предотвращение повреждений, вызванных перокисным окислением липидов	Митохондрии, цитоплазма и хлоропласты

К ферментам, ассоциированным с метаболизмом активных форм кислорода, относят: супероксиддисмутазу (SOD), которая участвует диспропорционировании супер–оксидных анион–радикалов до молекулярного кислорода и пероксида водорода, каталазу (САТ), которая, в свою очередь, катализирует разложение пероксида водорода до воды и кислорода, и ферменты пероксидазы (РОХ), которые принимают участие в восстановлении перекиси водорода до молекул воды (Xie X., 2019).

В таблице 3 представлены основные ферментные компоненты антиоксидантной системы растений (Sukweenadhi J., 2017).

В процессе воздействия на растения стрессора и формирования окислительного «стресса» в растительных клетках и тканях активно повышается содержание перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), супероксид–радикала ( $O^2$ ), атомарного кислорода ( $^1O^2$ ), и гидроксид–радикала ( $OH$ ) (Del Río L. A., 2015). Предполагается, что первым ферментом антиоксидантной системы, который активируется и участвует в нейтрализации повышенных уровней молекул активных форм кислорода, является фермент супероксиддисмутаза

SOD (Fe–SOD, Mn–SOD, Cu/Zn–SOD). Фермент SOD участвует в процессе диспропорционирования анион–радикалов до пероксида водорода и молекулярного кислорода. Фермент участвует в последовательном восстановлении и окислении супероксидными анион–радикалами металлов активного центра фермента, при этом достаточно сильно увеличивается скорость протекания реакции дисмутации по сравнению со спонтанной дисмутацией без участия SOD (Бараненко В. В., 2006).

Таблица 3

Основные ферментные компоненты антиоксидантной системы растений

Антиоксидантные ферменты	Катализ реакций	Локализация
Супероксиддисмутазы	$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Пероксисомы, митохондрии, цитоплазма, хлоропласты
Каталазы	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$	Пероксисомы и митохондрии
Аскорбатпероксидазы	$H_2O_2 + \text{аскорбиновая кислота} \rightarrow 2H_2O + \text{дегидроаскорбат}$	Пероксисомы, митохондрии, цитоплазма, хлоропласты
Дегидроаскорбат редуктазы	Дегидроаскорбат + восстановленный глутатион $\rightarrow$ аскорбиновая кислота + глутатион дисульфид	Митохондрии, цитоплазма, Хлоропласты
Гваякол пероксидазы	$H_2O_2 + \text{дегидроаскорбат} \rightarrow 2H_2O + 2 \text{ монодегидроаскорбат}$	Митохондрии, цитоплазма, хлоропласты, клеточная стенка, вакуоль

Далее в реакции вступают ферменты САТ и РОХ. Фермент САТ принимает участие в реакциях разложения перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) с образованием воды и молекулярного кислорода, а РОХ катализируют реакции восстановления  $H_2O_2$  (рис.6).



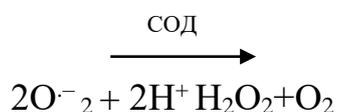
Рисунок 6. Антиоксидантные ферменты, участвующие в нейтрализации супероксид – радикала

В процессе эволюции у разных видов растений уровни и спектры низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов существенно отличаются. Однако, общим является практически для всех видов растений то, что антиоксидантная система позволяет контролировать уровни активных форм кислорода и предотвращать неблагоприятное действие повышенных концентраций ROS.

Вследствие этого, нами рассматривается активность антиоксидантных ферментов и их изоформ при действии биотического стрессора–вируса картофеля PVS<sup>0</sup> у растений картофеля сибирских сортов и их микроклонов.

### 1.6. Характеристика фермента супероксиддисмутаза (SOD), ассоциированного с выработкой активных форм кислорода

Фермент супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1) относится к антиоксидантным ферментам, которые выступают в роли основной защитной системы против окислительного стресса в растениях и присутствуют во всех растительных тканях (McCord, J. M., 1968). Фермент катализирует диспропорционирование супероксидных анион – радикалов до молекулярного кислорода и пероксида водорода:

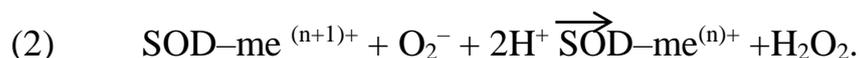
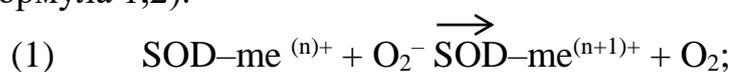


Супероксиддисмутаза обеспечивает первый защитный ответ от воздействия повышенных уровней радикалов окислительного стресса. Ферменты удаляют  $O_2^-$ , катализируя его дисмутацию, т.е. реакцию перегруппировки одной молекулы в две другие: одна молекула  $O_2^-$  превращается в  $H_2O_2$ , а другая молекула окисляется до  $O_2$ . Ферментами удаляется  $O_2^-$  и, следовательно, уменьшает риск образования  $OH^-$  через катализируемую металлом реакцию Габера – Вейса (McCord J. M., 1969). Поэтому, увеличение экспрессии уровней ферментов супероксиддисмутаза может защитить растения от неблагоприятных воздействий окружающей среды.

В ряде проведенных экспериментов было установлено, что повышенная экспрессия фермента супероксиддисмутаза у трансгенных растений *Brassica campestris* L. и *Pekinensis* cv., за счет активации гена Cu/Zn-SOD повышала их устойчивость к воздействию солевого стресса (Tseng M. J., 2013).

Супероксиддисмутаза считаются ключевыми ферментами в регуляции внутриклеточных уровней активных форм кислорода, и в поддержании нормальных физиологических состояний при окислительном стрессе (Faize M., 2011). Сообщается, что активность фермента SOD увеличивается у томатов (*Solanum lycopersicum*) (Gapińska M., 2009), чечевицы (*Lens culinaris*) (Kukreja, S., 2005), горчицы (*Brassica juncea*) (Dar M. I., 2015), риса (*Oryza*), и других растений, подверженных различным абиотическим стрессам, например, такими как солевой стресс, вирусная инфекция, пестицидная нагрузка, засуха (Sharma P., 2005) и токсичности металлов (Mishra S., 2011, Asada K., 1999) и др.

Механизм действия ферментов супероксиддисмутаза заключается в последовательных реакциях восстановления и окисления металлов, которые входят в состав активного центра фермента SOD супероксидными анион-радикалами (формула 1,2):



Где,  $me^{(n)+}$  – металл, входящий в состав активного центра, а  $me^{(n+1)+}$  – частично восстановленный металл (Fridovich, I., 1986).

В настоящее время у растений идентифицировано 3 типа ферментов супероксиддисмутаза, которые классифицируются в зависимости от металла, входящего в состав кофактора в активном центре фермента. В качестве металлов в активном центре выступают медь или цинк (Cu/Zn-SOD), марганец (Mn-SOD) и железо (Fe-SOD) (Гарифзянов А. Р., 2011; Kanematsu S., 1990).

При сравнении аминокислотных последовательностей у разных типов ферментов супероксиддисмутаза предполагается, что Mn- и Fe-SOD являются более древними типами ферментов супероксиддисмутаза, предполагается, что они возникли из одного и того же фермента – предшественника, тогда как Cu/Zn-SOD не имеют схожей последовательности и, вероятно, эволюционировали отдельно у эукариот (Bannister W. H., 1991).

Тип Fe-SOD, вероятно, является самой древней группой супероксиддисмутаза. Учеными было высказано предположение, что железо было первым металлом, используемым в качестве металлического кофактора в активном центре супероксиддисмутаза из-за обилия железа в растворимой форме Fe (II). Уменьшение количества Fe (II) в окружающей среде привело к переходу на использование более доступного металла Mn (III) (Alscher R. G., 2002; Hernandez J. A., 1993).

Супероксиддисмутаза типа (Cu/Zn-SOD) обнаружена в цитозоле растений (Hurst A., 2002; Kuzniak E., 2004), митохондриях (Corpas F. J., 2001), пероксисомах (Ogawa K., 1996), хлоропластах (Navari – Izzo F., 1998) и в межклеточном пространстве растительных клеток. Тип супероксиддисмутаза Fe – SOD встречается в хлоропластах (Kuzniak E., 2004), а тип фермента Mn – SOD – в митохондриях (Blokchina O., 2003). Была отмечена различная чувствительность к ингибиторам у разных изоформ ферментов супероксиддисмутаза:  $H_2O_2$  и цианиду ( $CN^-$ ). Тип ферментов

супероксиддисмутаза Cu/Zn-SOD ингибируются веществами  $\text{CN}^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ , в то время как ферменты Fe-SOD ингибируется  $\text{H}_2\text{O}_2$ , а изоформы фермента Mn-SOD обладают устойчивостью к действию данных веществ (Sharma P., 2012).

Увеличение активности молекул SOD в клетках растений при различных стрессорах окружающей среды может быть обусловлено активацией латентных форм фермента и/или синтезом новых молекул фермента.

### **1.7. Характеристика фермента каталазы (CAT), ассоциированного с выработкой активных форм кислорода**

Фермент каталаза (CAT, КФ.1.11.1.6) первый антиоксидантный фермент, который был обнаружен и охарактеризован учеными (Das, K., 2016). Это гемсодержащий фермент, который катализирует превращения молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$  (Nie, Q., 2015, Su, Y., 2014). Ферменты CAT преимущественно локализируются в пероксисомах растений. У высших растений фермент присутствует во всех дифференцированных пероксисомах, включая пероксисомы листьев, семядолей, корней, глиоксисомы и неспециализированных пероксисомах (Shugaev A.G., 2011). Имеются литературные данные о наличии фермента каталазы и в митохондриях растений (Mhamdi A., 2010). В ряде исследований зарубежными учеными было установлено, что антиоксидантный фермент CAT также присутствует в субклеточных органеллах, таких как: хлоропласты и митохондрии, а также в цитозоле, однако, об активности фермента в этих компартаментах до сих пор нет достаточного количества данных (Anjum N. A, 2014; Dar M.I., 2017). В настоящее время стало известно, что у покрытосеменных растений присутствуют различные изоформы ферментов каталазы (Sharma, P., 2012).

Каталаза имеет быструю скорость реакции ( $U=10^7$ ) и является исключительным среди антиоксидантных ферментов, так как может функционировать без дополнительных доноров электронов. Ферменты

содержат 4 железосодержащих порфириновых группы, которые отвечают за взаимодействие с молекулами  $H_2O_2$ . Одна молекула фермента способна вызвать распад  $6 \cdot 10^6$  молекул перекиси водорода в секунду (Гарифзянов А. Р., 2011). Фермент обладает способностью реагировать с субстратами в достаточно широких колебаниях уровней pH (от 4 до 11) и температурных рамок, в зависимости от видовой принадлежности (Ергалиев Т. М., 2016).

Фермент САТ является одним из ключевых ферментов, которые принимают участие в реакциях нейтрализации молекул активных форм кислорода на начальных этапах, в основном за счет ее присутствия в фотосинтезирующей ткани, в которой и происходит нейтрализация токсических веществ.

### **1.8. Характеристика ферментов пероксидазы (РОХ), ассоциированных с выработкой активных форм кислорода**

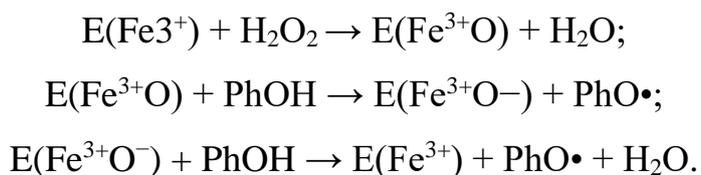
Среди апопластических ферментов, участвующих в защитной системе растений, решающую роль играют пероксидазы III класса (КФ 1.11.1.7). Как правило, пероксидазы являются гликопротеинами, содержат протогемин в качестве простетической группы и секретируются в клеточных стенках, апопластах или вакуолях (Tognolli, M., 2002). Пероксидазы являются достаточно высоко термостойкими ферментами и весьма чувствительными индикаторами воздействий окружающей среды на растения картофеля.

РОХ принимает участие в использовании кислородных ресурсов клетки, причем уровни фермента резко увеличиваются при повреждениях клеток растений, и при этом происходит более интенсивная активация процесса дыхания. Ферменты в большом количестве накапливаются в клеточных стенках стареющих тканей растений, при этом они могут проявлять оксидазную и пероксидазную активности, используя в качестве акцептора электронов молекулярный кислород или пероксид водорода.

Фермент РОХ III класса катализирует восстановление молекул перекиси водорода, используя при этом в качестве донора электронов разные молекулы, такие как: фенолы (гидрохинон, пирокатехин, гваякол), глутатион, аскорбиновую кислоту, ароматические кислоты. РОХ III класса содержатся практически во всех компартментах растительных клеток: хлоропластах (в строме и в мембранах тилакоидов), в мембранах глиоксисом, пероксисом, митохондрий, в цитозоле, клеточной стенке. Причем, особенно важной особенностью каталитической активности пероксидаз является производство свободных радикалов, которые могут вступать в спонтанные реакции, протекание которых зависит от присутствия в среде  $Mn^{2+}$ , а также фенольных кофакторов. Некоторые продукты свободнорадикальных реакций также являются субстратами пероксидазы. Большое количество параллельно протекающих каталитических и спонтанных реакций с участием РОХ, отчасти и объясняет необычно большое разнообразие реакций, катализируемых пероксидазами.

Ферменты содержат восемь консервативных последовательностей цистеинов и один/или несколько сайтов гликозилирования, в зависимости от видовой принадлежности. У растений *Arabidopsis thaliana* имеется 73 гена, которые кодируют пероксидазу (Mathé C., 2010), а у растений *Oryza sativa* имеется 138 генов (Passardi, F., 2004). Пероксидазы участвуют в контроле уровней активных форм кислорода, вырабатываемых в клетках растений, подверженных воздействию стрессовых факторов, являющиеся «ключом» к активации оксидоредуктаз в «иммунной системе растений», активируя сигнальные механизмы или клеточную гибель. В настоящее время, согласно исследованиям С. Penel (Penel C., 2009), L. Almagro (Almagro L., 2008), A. Daudi ([Daudi A., 2012), J. A. O'Brien (O'Brien J.A., 2012) и др. было подтверждено, что увеличение активности апопластических пероксидаз является ранней реакцией растений на биотические и абиотические стрессы (Minibayeva, F., 2009; Lehtonen M.T., 2009).

В пероксидазном цикле фермент пероксидаза  $E(Fe^{3+})$  вступает во взаимодействие с молекулой  $H_2O_2$  и переходит в соединение I —  $E(Fe^{3+}O)$ , после чего окисленный фермент восстанавливается в результате последовательных одноэлектронных окислений фенольного субстрата ( $PhOH$ ). Вначале в соединение II —  $E(Fe^{3+}O^-)$  — и после этого возвращаясь в исходное нативное состояние:



Пероксидазный цикл представляет собой протекание следующей реакции:  $2PhOH + H_2O_2 \rightarrow 2PhO\bullet + 2H_2O$ . Феноксильные радикалы ( $PhO\bullet$ ) образуют димеры, олигомеры или такой полимер, как лигнин.

Отмечается, что наиболее ранним ответом на воздействие механического повреждения в качестве стрессора, а также в ответ на инфицирование вирусной инфекцией у растений разных видов, таких как арабидопсис (*Arabidopsis*), пшеницы (*Triticum*), риса (*Oryza*), является высвобождение ферментов пероксидаз в апопастах (Huang A., 2020).

При изучении реакции растений арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) на механические повреждения в лабораторных условиях, у растений отмечается повышение активности ферментов (Benikhlef L., 2013). Более того, поранение одной листовой пластинки у растения, может приводить к увеличению активности ферментов и в рядом расположенных листьях, которые не были подвержены воздействию (An Y., 2009). В результате изучения механического воздействия поранением корневой системы у растений гороха (*Pisum sativum*), также наблюдалась активность связанных с плазматической мембраной пероксидаз в корнях (Roach T., 2015).

Роль ферментов пероксидазы в ответ на воздействия температурным стрессором была исследована у растений чувствительного Faikbey и устойчивого Yeniceti сортов овса (*Avena sativa* L.). По результатам исследований было установлено, что на устойчивость к температурному

стрессу у овса также оказывает влияние фермент пероксидаза (Kutlu I., 2016). В процессе изучения температурного стресса, а именно повышения температуры до 42<sup>0</sup>С в течение 24 часов, воздействию Метилвиологена (MV) в разных концентрациях (0, 200, 300 и 400 мкМ), у трансгенных растений картофеля с промотором SWPA2, который контролирует экспрессию генов, ответственных за синтез ферментов супероксиддисмутаз (CuZn-SOD) и пероксидаз было установлено, что активность пероксидаз повышается у ГМ – растений по сравнению с контрольной группой растений (Kim M. D., 2010; Kutlu, I., 2016).

При исследовании абиотических стрессовых факторов, таких как УФ – облучение у растений риса (*Oryza sativa* L.) (Krishnamurthy P., 2009), воздействия озона на растения батата (*Ipomoea batatas*) (Kim Y. H., 2007), температурных стрессоров у сосны (*Pinus*) (Тао D. L., 1998), а также воздействия патогенов и насекомых на растения томатов (*Solanum lycopersicum*) (Kuzaniak E., 2005), активность фермента антиоксидантной системы POX увеличивалась.

В ходе исследований по влиянию солевого стрессора NaCl в различной концентрации (30, 60, 90, 120 моль/л) в течение 4 недель на разные по восприимчивости сорта картофеля (*Solanum tuberosum* L.) солеустойчивый сорт Kennebec и восприимчивый сорт картофеля Concord, было отмечено, что активность пероксидазы была увеличена у сорта Kennebec и не зависела от концентрации NaCl, в то время как у сорта Concord наблюдалась обратно пропорциональная зависимость активности пероксидаз от дозы солевого стрессора, что может свидетельствовать о способности пероксидаз оказывать воздействие на солеустойчивость у сорта Kennebec (Aghaei K., 2009).

Пероксидаза является основным ферментом антиоксидантной системы растений в поддержании окислительно–восстановительного баланса в тканях растений в условиях стрессового воздействия, которые отражаются на росте и развитии растений.

## **1.9. Основные места генерации активных форм кислорода (ROS) в растительных клетках**

Активные формы кислорода образуются как в нормальных условиях в клетках растений, так и при стрессовом воздействии, в таких органеллах растительных клеток, как: хлоропласты, митохондрии, эндоплазматический ретикулум, плазматические мембраны, пероксисомы и клеточные стенки (Sharma, P., 2012). В хлоропластах и пероксисомах растений отмечается наиболее активное образование ROS при световых условиях, в то время как митохондрии являются основными местами генерации ROS в условиях темноты (Choudhury S., 2013; Suzuki N., 2012).

Синглетный кислород образуется в хлоропластах растений при взаимодействии молекулярного кислорода с хлорофиллом, который возбужден квантом света, в ходе данного процесса идет обращение спина одного электрона и формирование синглетного кислорода. Формирование супероксидного анион-радикала осуществляется в фотосистеме I и II хлоропластов, а также на комплексах дыхательной цепи в митохондриях. В процессе переноса электронов за счет приобретения дополнительной энергии идет нарушение процесса передачи. Передача электрона с Fe-S центра фотосистемы (I) или при восстановлении кислорода ферредоксином наблюдается образование супероксидрадикала. В пероксисомах молекулы активных форм кислорода образуются за счет процесса фотодыхания или процессов окисления жирных кислот. Дыхательная цепь органелл митохондрий является еще одним источником супероксидрадикала и перекиси водорода в клетках растений, за счет за счет убихинонового радикала и комплекса (III) и НАДН – дегидрогеназы (Gechev T. S., 2006).

Молекулы перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) образуются в процессе нейтрализации супероксидного анион – радикала совместно с ферментом антиоксидантной системы SOD, а также в других реакциях, которые

протекают в пероксисомах и глиоксисомах. В апопластах клеток источниками образования молекул  $H_2O_2$  являются реакции, катализируемые ферментами полиаминоксидазой и диаминоксидазой, которые приводят к деградации ди- и полиаминов, а фермента, связанного с плазмалеммой – НАД(Ф)Н-оксидаза (Moschou P., 2008).

Отмечено, что при высоком уровне содержания ROS – «окислительном взрыве» идет повреждение липидов, белковых молекул, а также ДНК (Киимова З.С., 2013). Липиды, входящие в состав плазматической мембраны клеток растений, подвергаются пероксидному окислению в результате генерации и накопления высоких концентраций ROS. Взаимодействуя с органическими веществами, образует гидропероксиды ДНК, белков, липидов. ROS могут приводить к повреждениям белков, которые проявляются в окислении-SH-групп, FeS-центров ферментов, фрагментации пептидных цепей, повышении чувствительности для протеаз (Mullineaux P. M., 2005; Berni R., 2019).

ROS оказывают взаимодействие и с нуклеиновыми кислотами, приводя к повреждениям азотистых оснований дезоксирибозы и рибозы, а также в появлении новых ковалентных связей. Ключевыми молекулами – «мишенями» для ROS являются липиды, которые являются компонентами клеточных мембран растительных клеток. У мембран проявляется повышение проницаемости для ионов и органических веществ, а продукты перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, 4-гидроксиалкенали) обладают мутагенной активностью и блокируют клеточное деление растительных клеток. Под влиянием повышения уровней активных форм кислорода в результате воздействия стрессовых факторов окружающей среды с белковыми молекулами могут происходить различные изменения. Белковые молекулы могут подвергаться нитрозилированию, карбонилированию, образованию дисульфидных связей и глутатионилированию (Tanou G., 2009).

Установлено, что  $\text{OH}\cdot$  является наиболее реакционноспособным промежуточным продуктом и вызывает повреждение всех компонентов молекул ДНК, повреждая пуриновые и пиримидиновые основания, а также дезоксирибозу (Halliwell В., 1991). Стрессовые факторы среды вызывают снижение фиксации  $\text{CO}_2$ , уменьшение образования НАДФ<sup>+</sup> в цикле Кальвина, а также меняются кислотно–основные свойства цитоплазмы клеток растений, все эти нарушения приводят к нарушениям в других метаболических реакциях клеток, вызывая негативные последствия.

### **1.10. Регуляция активности антиоксидантных ферментов у растений**

Система антиоксидантной защиты растений кодируется и регулируется большим количеством генов: в ходе стресс–индуцированной генерации ROS в клетке протекают процессы по изменению экспрессии большого числа генов, в том числе, генов антиоксидантных ферментов и метаболизма низкомолекулярных протекторных соединений (Но Т. Т., 2020).

По результатам научных исследований ученых Kwon S.Y., Jeong Y.J., Lee H., трансгенные растения табака, экспрессирующие ферменты Cu/Zn – SOD и аскорбатпероксидазу в хлоропластах под контролем промотора CaMV 35S, были более устойчивы к солевому стрессу, в отличие от дикого типа растений (Kwon S. Y., 2012).

По результатам исследований Asada K., Kim K. Y. проводимых над растениями картофеля, были изучены трансгенные линии, которые экспрессировали фермент Cu/Zn–SOD и аскорбатпероксидазу под контролем промотора SWPA2 (Allen R. D., 1997; Asada K., 1999; Kim K. Y., 2003), индуцируемого окислительным стрессом (Tang, L., 2004). В результате исследований было установлено, что трансгенные растения картофеля, имели более повышенную устойчивость к солевому стрессу (до 250 мкМ) и на четверть меньше внешних повреждений, по сравнению с контрольными линиями картофеля (Tang L., 2006).

При исследовании по улучшению показателей устойчивости к повышенному температурному воздействию у картофеля (*S. tuberosum* L.) было установлено, что трансгенная линия растений с генами Cu/Zn-SOD и APX, которые были экспрессированы в хлоропластах под контролем промотора SWPA2, индуцируемым окислительным стрессом, отличалась более активной фотосинтетической активностью по сравнению с контрольной группой растений. При воздействии на растения картофеля тепловым стрессором (42<sup>0</sup>C) в течение 20 часов, у трансгенной линии растений фотосинтетическая активность снижалась на лишь на 6%, по сравнению с диким типом, у которых фотосинтетическая активность снижалась до 29% (Rahnama H., 2009).

В результате исследования по влиянию солевого стресса (NaCl) на картофель (*S. tuberosum* L.) у разных по восприимчивости сортов, а именно чувствительных сортов: Diamant, Ajax и солеустойчивых сортов: Agria, Kennebec, была отмечена разная активность антиоксидантных ферментов. Масса побегов у сортов Agria и Kennebec не изменилась при воздействии 50 мМ NaCl, тогда как у сорта Diamant и Ajax она снизилась до 50% по сравнению с контролем. У сортов картофеля Agria и Kennebec активность SOD увеличивалась при 50 мМ NaCl, но не наблюдалось значительных изменений у сортов Diamant и Ajax, однако при более высокой концентрации NaCl активность SOD снижалась у всех сортов картофеля. Активность ферментов CAT и POX увеличилась у всех сортов при солевом стрессе. В отличие от других сортов картофеля у проростков сорта Ajax активность фермента APX увеличивалась в ответ на воздействие стрессора NaCl. Была отмечена также и активность изоферментов POX и SOD, при этом наблюдалось изменение в изоферментном составе при солевом стрессе. Отмечается, что у солеустойчивых сортов картофеля Agria и Kennebec, имеется более эффективная защита от повышенной генерации ROS, за счет повышения уровней антиоксидантных ферментов, в частности фермента SOD

по сравнению с чувствительными сортами картофеля Diamant и Ajax (Shafi A., 2017).

При изучении ферментативной активности у трансгенных линий картофеля (*S.tuberosum* L.), сверхэкспрессирующем два гена, а именно, термостабильный ген Cu/Zn-SOD (Pa-SOD) из полиэстремофильного высокогорного растения лапчатки тёмно – красной (*Potentilla atrosanguinea*) и ген перекиси аскорбата (RaAPX) из растения гималайский ревень (*Rheum australe*) в условиях солевого стресса. Трансгенные линии и линии дикого типа (WT) оценивали при концентрациях 50, 100 и 150 мМ обработки NaCl. Хотя активности супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы в трансгенных линиях были значительно выше, чем у контрольной группы растений при солевом стрессе, на лигнификацию вторичной клеточной стенки в значительной степени влияли модулированные активности антиоксидантных ферментов. Трансгенные растения картофеля обладали повышенным содержанием крахмала, улучшенными характеристиками ростовых процессов и сниженным накоплением активных форм кислорода, по сравнению с контрольной группой растений (Rahnama H., 2006).

При изучении уровней антиоксидантных ферментов в каллусной культуре картофеля у сортов Diamant, Ajax, Agria, Kennebec, культивируемых на питательной среде с разной концентрацией соли 0, 50, 100 и 150 мМ NaCl в условиях полной темноты, ростовые процессы каллусной культуры у всех сортов были значительно снижены. При этом отмечалось, что значительную роль в освобождении клеток от радикалов играли изоформы ферментов Mn-SOD, которые, возможно, продуцировали образование O<sub>2</sub> в митохондриях (Shafi A., 2014).

При изучении солевого стресса у дикого тика (*Pterocarpus angolensis*) и трансгенных растений батата (*Ipomoea batatas*), учеными было выдвинуто предложение, что трансгенные растения батата под контролем промотора (SWPA2), отвечающим за экспрессию уровней антиоксидантных ферментов Cu/Zn-SOD и APX, проявляли повышенную устойчивость по сравнению с

диким типом. У ГМ–растений наблюдался более эффективный рост корневой системы при воздействии солевого стресса. Уровни экспрессии Cu/Zn – SOD и APX у трансгенных растений под действием солевого стресса, были значительно выше (до 13,3 раз) по сравнению с линией растений дикого типа (7,8 раз), что подтверждает важную роль данных ферментов в начальном этапе защиты клеток от окислительного стресса при засолении (Rahnama H., 2005).

При изучении теплового стресса у чувствительной линии (84–S) и засухоустойчивой (M–503) линии сортов хлопка, было показано, что более устойчивым к стрессору оказался засухоустойчивый сорт хлопка (M–503), который обладал существенной активностью ферментов SOD и APX, а также CAT и POX (Yan, H., 2016). В ряде исследований было установлено, что трансгенные растения со сверхэкспрессией уровней ферментов супероксиддисмутаза, обладали большей устойчивостью к различным абиотическим стрессорам (Meloni D. A., 2003; Shigeoka S., 2014).

Однако, при изучении активности антиоксидантных ферментов у растений риса (*Oryza sativa* L.), пшеницы (*Triticum aestivum*) и огурца (*Cucumis sativus*) в ответ на воздействие солевого стрессора (NaCl), наблюдалось снижение активности фермента каталазы (Yildiz–Aktas, L., 2009), а также в результате исследований при длительном влиянии солевого стрессора на растения пшеницы у устойчивого сорта Kharchia 65 и умеренно чувствительного сорта KRL 19, было отмечено, что устойчивые сорта пшеницы обладали более высокой активностью SOD, CAT, глицин – бетаина, у данных растений отмечалось более низкое содержание уровня H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sahin A., 2010).

В экспериментах по воздействию повышенного фитотоксического эффекта (SO<sub>2</sub>) и солевого стресса (NaCl), изучали трансгенные растения кукурузы (*Zea mays*) и китайской капусты (*Brassica campestris* L. ssp. Pekinensis cv. Tropical Pride), которые экспрессировали гены Cu/Zn–SOD и CAT и группа растений дикого типа. У растений, содержащих SOD + CAT,

отмечалась повышенная устойчивость к воздействию SO<sub>2</sub>. Кроме этого, когда ГМ–растения капусты подвергали солевому стрессу (200 мМ NaCl) в течение 4 недель, фотосинтетическая активность растений уменьшилась лишь на 6%, по сравнению с 72% у группы растений дикого типа (Sairam R. K., 2002; Tseng M. J., 2007; Xu J., 2013).

В ряде научных трудов исследователей при изучении коэкспрессии генов, ответственных за увеличение экспрессии ферментов Cu/Zn – SOD в хлоропластах или цитозоле табака (*Nicotiana tabacum*), картофеля (*Solanum tuberosum*) и батата (*Ipomoea batatas*), отмечается повышенная устойчивость к большинству биотических стрессоров, включая воздействие гербицидов (MV), низких и высоких температур, и засухи (Kwon S. Y., 2002; Tang L., 2006; Kim Y. H., 2015; Faize M., 2015).

В ходе исследования по определению активности функционирования антиоксидантной системы у двух разных по восприимчивости и срокам созревания сортов картофеля (*S.tuberosum* L.), в результате воздействия стрессора (NaCl), было установлено, что раннеспелый сорт Жуковский накапливал в листьях пролин и повышался уровень SOD, при снижении активности ПОХ. Сорт картофеля Луговской также накапливал в листьях пролин, однако у данного сорта отмечалось повышение не только SOD, но и ПОХ (Murgan O. K., 2019).

Обращает на себя внимание тот факт, что активность антиоксидантных ферментов определяется не только дозой воздействия стрессора, но также продолжительностью воздействия стрессора и видовой принадлежностью растений. Следует отметить, что разные сорта картофеля обладают различными физиологическими реакциями в ответ на воздействие биотических и абиотических стрессовых факторов. В связи с этим изучение физиологической активности антиоксидантных ферментов у отечественных генотипов картофеля и полученных от них микроклонов при воздействии стрессоров является перспективным направлением исследований.

## Выводы к первой главе

Анализ современной научной литературы показал, что у растений картофеля под воздействием таких биотических и абиотических стрессоров как: загрязнения почв тяжелыми металлами, солевого и температурного стрессоров, охлаждения, развития вирусной и бактериальной инфекции и др., могут являться причинами нарушения клеточного гомеостаза, характеризующимся повышением уровней активных форм кислорода.

В свою очередь, высокие уровни ROS могут оказывать негативный эффект на липиды, белки, хлоропластную и митохондриальную молекулы ДНК, а также приводить к гибели клеток – апоптозу.

В результате эволюции, у растений появилась достаточно эффективная антиоксидантная система защиты от окислительного стресса, в которую входят следующие ферменты: каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза и другие ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты, причем у разных генотипов картофеля физиологическая активность ферментов различна.

В настоящее время широкую перспективу открывает дальнейшее изучение активности антиоксидантных ферментов и соединений для создания линий растений устойчивых к повреждающим факторам окислительного стресса, возникающего в связи с повышением концентрации активных форм кислорода, под воздействием абиотических и биотических стрессовых факторов, а также возможности использования в качестве маркерных признаков для возможности проведения ранжирования по селекционно – ценному признаку – устойчивости к вирусным инфекциям картофеля и проведения работ по селекции и созданию новых комплексно устойчивых сортов картофеля.

Анализ современных разработок и научных трудов ведущих специалистов в области клеточных технологий, молекулярной биологии, биохимии, биотехнологии и селекции, также показали актуальность физиологической активности ферментов антиоксидантной системы у

растений картофеля под воздействием различных стрессовых факторов для более эффективного сочетания традиционных и современных методов. Несмотря на то, что в последние годы достигнуты высокие результаты по изучению генерации активных форм кислорода в ответ на стрессоры окружающей среды, многие аспекты все еще остаются малоизученными и наблюдается недостаток знаний по некоторым функциям молекул активных форм кислорода.

Существует необходимость изучения физиологического ответа у сортов картофеля отечественной селекции и полученных микроклонов, отличающихся по восприимчивости к вирусам и срокам созревания, для более детального понимания процессов передачи сигналов и активации защитных механизмов растений картофеля при повышении уровня активных форм кислорода под воздействием вирусно инфекции.

## ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Объекты исследований

В качестве объектов исследований были использованы сибирские сорта картофеля Алена, Ермак, Хозяюшка, полученные специалистами Сибирского научно–исследовательского института сельского хозяйства, (ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»). Исследования проводили на микроклонах картофеля, полученных их каллусных культур в ходе выполнения исследований. Выбор в качестве высокоурожайных и перспективных отечественных сортов был основан на проведенных маркетинговых исследованиях г. Омска и Омской области среди разных возрастных и социальных групп на основании опроса. По результатам опроса было установлено, что наиболее известными среди населения региона и востребованными сортами были сорта Ермак (86%) и Алена (81%) и Хозяюшка (76%) (Костина Л.Н., 2007).

Сорт картофеля Алена (СИБИРСКИЙ НИИСХ, ВНИИКХ) – ранний, крупноплодный, высокоурожайный сорт картофеля, полученный при скрещивании сортов Седов, Камераз и Зарево.

Растение средней высоты, промежуточного типа, раскидистое. Лист крупный, зеленый. Листочек большого размера, широкий. Волнистость края отсутствует или очень слабая. Венчик среднего размера, красно–фиолетовый. Товарная урожайность 17,2 – 29,2 т/га. Дружно формирует клубни. Сорт включен в государственный реестр селекционных достижений России в 2000 году. Картофель Алена районирован в нескольких регионах страны: Волго–Вятском, Уральском, Западно–Сибирском, Восточно–Сибирском и Дальневосточном. Сорт выделяется среди других сортов картофеля и востребован у населения Омской области за счет наличия ряда положительных характеристик таких как: отличные вкусовые и качественные характеристики, стабильность урожая в разных почвенно–климатических

зонах, устойчивостью к температурным стрессам и механическим повреждениям, а также пригодностью к механизированной технологии возделывания (Панкратова И., 2022).

Средняя масса клубней составляет 120 – 180 г, которые имеют овальную форму, слегка придавленные (Рис. 7). Кожура у сорта красного цвета с белой мякотью. Ростки имеют красно–фиолетовый цвет, глазки небольших размеров. В среднем на одном растении формируется 6 – 9 клубней.

Содержание крахмала в клубнях сорта Алена составляет 15 – 17%, сорт является низкоколорийным картофелем с содержанием 80 ккал на 100 г., где редуцирующих сахаров – 0,2 %. Сорт Алена обладает отличной товарностью 81 – 97% и высокой лежкостью до 95%, а также обладает устойчивостью к комплексу грибных, бактериальных и вирусных инфекций (Александров М.Ю., 2021).

Картофель сорта Алена устойчив к возбудителю рака картофеля, ризоктониозу парше обыкновенной, восприимчив к золотистой картофельной цистообразующей нематоды, фитофторозу.



Рисунок 7. Сорт картофеля Алена (Черемисин А.И., 2022).

Согласно данным С. Н. Еланского и Е. М. Чудиновой по устойчивости картофеля к вирусам ранний сорт Алена обладает умеренной восприимчивостью к вирусам PVX, PVY, PVM и умеренной устойчивостью к вирусам PLRV, PVS (Еланский С. Н., 2016).

Сорт картофеля Ермак (СИБИРСКИЙ НИИСХ) – ранний столовый сорт, выведенный клоновым отбором сорта Ранняя роза. Сорт включен в государственный реестр селекционных достижений России с 1978 года. Сорт картофеля Ермак районирован в Западно–Сибирском регионе (Иванов А., 2022).

Клубни картофеля розовые, имеют овально–округлую форму, за счет большого размера клубней, данный сорт картофеля получил название «лапоть» среди населения за счет формы клубней (Рис. 8). Клубни имеют мелкие глазки, мякоть у картофеля белая с красными включениями. Венчик бледно – фиолетового цвета. Средняя урожайность картофеля 35 – 47 т/га, масса товарного клубня 90 – 120 г. В среднем на одном растении формируется 9 – 12 клубней. Сорт Ермак обладает отличной товарностью 87 – 92%. Содержание крахмала в клубнях картофеля составляет 10 – 12%.

Сорт Ермак выделяется среди других сортов картофеля и пользуется большим потребительским спросом у населения Омской области за счет наличия ряда положительных характеристик таких как: отличные вкусовые и качественные характеристики, дружная отдача урожая в разных почвенных условиях, устойчивость к температурным стрессам и механическим повреждениям, отзывчивость на внесение удобрений и орошение.



Рисунок 8. Сорт картофеля Ермак (Севоян В.А., 2022).

Сорт картофеля Ермак в средней степени поражается паршой обыкновенной, неустойчив к раку. Данный сорт картофеля обладает средней восприимчивостью к вирусам и нуждается в защите (Храмцова И. Ф., 2018).

Несмотря на рекомендации специалистов по возделыванию сорта Ермак на территории Западно – Сибирского округа, этот сорт в свое время, успешно распространился по всей территории России. Культура распространилась также в других странах и даже принимала участие в международных выставках. Однако, впоследствии данный сорт картофеля вытеснили сорта зарубежной селекции.

Сорт картофеля Хозяюшка (СИБИРСКИЙ НИИСХ) – среднеспелый, высокопродуктивный сорт, выведен из сортов Сантэ и Зарево. Сорт включен в государственный реестр селекционных достижений РФ в 2009 году. Сорт картофеля Хозяюшка районирован в двух регионах страны: Западно–Сибирском и Восточно–Сибирском. Растение картофеля данного сорта высокое, промежуточного типа, полупрямостоячее. Лист крупный, открытый, темно–зеленого цвета с сильной волнистостью края. В пазухах листьев наблюдается антоциановая окраска (Дергачева Н. В., 2013).

Клубни картофеля имеют красную кожуру, овально – округлую форму с мелкими глазками и белой мякотью (Рис.9). На одном растении в среднем формируется 8 – 14 клубней, средний вес которого составляет 101 – 179 г.



Рисунок 9. Сорт картофеля Хозяюшка (Петров П.Д., 2017).

Сорт картофеля дружно формирует клубни, товарная урожайность составляет 39,5 т/га. Содержание крахмала в клубнях сорта Хозяюшка составляет – 17 – 19%, а также сорт содержит высокие показатели белка – 2,6%. Хозяюшка обладает отличной товарностью 87 – 97% и лежкостью – 95%.

Сорт выделяется среди других сортов картофеля и востребован у населения Омской области за счет наличия ряда положительных характеристик таких как: отличные вкусовые и качественные характеристики, стабильностью урожая в разных почвенно – климатических зонах, устойчивостью к температурным стрессам и механическим повреждениям, высоким содержанием крахмала и белка, отзывчивостью на внесение удобрений.

Данный сорт картофеля устойчив к возбудителю рака и золотистой картофельной цистообразующей нематоды, обладает полевой устойчивостью к вирусным заболеваниям, фитофторозу ботвы и клубней (Дорожкин, Б. Н., 2006). Сорт обладает умеренной восприимчивостью к вирусу PVY, умеренной устойчивостью к вирусам PVL, PVS, PVX, и обладает устойчивостью к вирусу PLRV (Дергачева Н. В., 2019).

## **2.2. Получение каллусной ткани картофеля в условиях *in vitro***

Получение первичной каллусной культуры, пассирование, индукцию стебельного органогенеза проводили по методике Е.А. Калашниковой с некоторыми модификациями (Калашникова Е. А, 2006).

Клубни первоначально отмывали от загрязнений под теплой проточной водой с мылом, после шестикратно промывали дистиллированной водой. Затем клубни стерилизовали погружением в 96% этиловый спирт на 15 секунд с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой. После этого клубни помещали в термостат при температуре  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  для инициации образования побегов. Срок проращивания варьировал в

зависимости от сортовых особенностей и составлял 30–45 суток до получения ростков (1–2 см). Из сформировавшихся побегов изолировали первичные экспланты. В качестве эксплантов использовали листья и стебли. Средний размер эксплантов составлял 4–6 мм (Швидченко В. К., 2018).

Стерилизацию стеблевых и листовых эксплантов осуществляли в 4% растворе гипохлорита натрия («Белизна») в течение 10 минут. Далее экспланты погружали в 70% спирт на 1 минуту с последующей трехкратной промывкой дистиллированной водой (Балакина А. А., 2012). Изолирование эксплантов картофеля проводили в асептических условиях ламинар – бокса (Lamsystems air flow).

Для изучения сравнительной характеристики каллусобразующей способности сортов картофеля, был выбран состав питательной среды, согласно рекомендациям Khalafalla M.M., Shirin F (Khalafalla M. M., 2010). Питательная среда содержала макро– и микроэлементы по прописи Мурасиге–Скуга (МС) (Аветисов В. А., 1985) с дополнительным внесением регуляторов роста: 2,4–дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4–Д) в концентрации 1–5 мг/л и 6 – фурфуриламинопуридин (кинетин) в концентрации 0,05 – 0,25 мг/л. Кроме того в состав питательной среды входили сахара 30000 мг/л и агар 7000 мг/л (Вальдеррама Ромеро А.С., 2002).

В качестве контрольного варианта использовали питательную среду без гормонов. Питательную среду стерилизовали автоклавированием (СПБА – 75 – I – НН, Россия) при 121<sup>0</sup>С, 1 атм., 20 минут (ГОСТ 17227 – 71, 1980). Уровень рН доводили до 5,8, который регулировали 1н НСl и 1н КОН (ГОСТ 17227 – 71, 1980). Фитогормоны стерилизовали фильтрованием с помощью мембранных фильтров (Spritzen/Syringe–Filter) с размером пор 0,22 мкм.

Изолированные стеблевые и листовые экспланты культивировали в чашках Петри, в условиях термостата (26±2<sup>0</sup>С) при полной темноте (Сидякин А. И., 2011) и при освещенности – 5000 лк. Пассирование каллусной ткани осуществляли через 30 – 35 суток.

Соматклоны получали из каллусной ткани на 1, 7 и 19-ом пассаже. Для этого был использован активно растущий каллус, который отличался идентичностью по фенотипическим показателям.

### **2.3. Регенерация растений *in vitro***

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). (Айтбаев Т.Е., 2009). Каллусы культивировали при температуре 22 – 24<sup>0</sup>С, регенеранты при освещенности 5000 лк, 16-ти часовом фотопериоде.

### **2.4. Регенерация растений из апикальной меристемы**

Клубни картофеля для изолирования апикальных меристем очищали от загрязнений и хранили в течение 7 суток при температуре 4 – 8<sup>0</sup>С, затем проводили термотерапию в условиях темноты при температуре 27 – 29<sup>0</sup>С. В этих условиях наблюдали прорастание глазков и формирование этиолированных побегов. Затем температуру в термостате повышали до 35 – 37<sup>0</sup>С и в этих условиях клубни с проростками находились еще в течение 7 суток. После термотерапии, клубни вынимали из термостата, отделяли от них этиолированные побеги и переходили к получению асептической культуры. Для этого этиолированные проростки стерилизовали 0,1% раствором сулемы в течение 3–4 минут, затем промывали трижды стерильной дистиллированной водой.

Изолирование апикальных меристем проводили с использованием профессиональной хирургической бинокулярной лупы (Goldensun C1–4X) при 10-ти кратном увеличении с помощью препаравальной иглы. Размер меристем составил 0,2–0,5 мм и они содержали один примордиальный листочек. Изолированные меристемы культивировали на агаризованной

питательной среде в пробирках, содержащей минеральные элементы по МС и повышенным содержанием цитокининов (БАП – 2 мг/л) (Широков А.И., 2012).

В состав питательной среды входили такие компоненты как: сахароза 20000 мг/л, глюкоза 20000 мг/л, гидролизат казеина 1000 мг/л, мезо–инозит 100 мг/л, тиамин 1 мг/л, пиридоксин 1 мг/л, аденин 40 мг/л, витамин В12 0,015 мг/л, гибберелиновая кислота 1 мг/л, никотиновая кислота 2 мг/л, фолиевая кислота 0,5 мг/л, кинетин 0,5 мг/л, пантеонат Са 10 мг/л, рибофлавин 0,5 мг/л, биотин 1 мг/л, активированный уголь 10000 мг/л, агар–агар 7000 мг/л (ГОСТ 29105.1 – 91, 1991; Ghaffoor A. G., 2003; Murashige, T. A., 1962). Культивирование проводили при  $22 \pm 25^{\circ}\text{C}$ , освещенности 1500 лк в условиях светового дня – 12 часов в течение 30 суток, после этого пробирки переносили в камеру с освещенностью 5000 лк еще на 30 суток.

Полученные растения в дальнейшем клонировали путем микрочеренкования. Микрочлониальное размножение растений картофеля проводили согласно ГОСТу (ГОСТ 29267 – 91, 2010) на агаризованной питательной среде с дополнительным внесением 0,5 мг/л феруловой кислоты, 1 мг/л кинетина, 1 мг/л тиамина, 1 мг/л пиридоксина, 20 000 мг/л сахарозы, 7000 мг/л агара.

Для исключения контаминации периодически проводили диагностику оздоровленного материала картофеля методом ИФА. Сомнительные образцы растений выбраковывали. Безвирусные пробирочные растения – регенеранты культивировали при условиях освещенности 5000 лк в течение светового дня 16 часов и 8 часов темноты, при средней температуре воздуха  $25^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности воздуха 70%.

## **2.5. Выращивание растений – регенерантов в почвенных условиях**

В лаборатории «Клеточная биотехнология» на базе ООО «Элита» (г.Омск) (Приложение 3) была получена коллекция безвирусных

микрклонов сортов Алена, Ермак, Хозяюшка. Полученные растения-регенеранты выращивали на обогащенной почве (Terra Vita, Россия). Для высадки растений почву стерилизовали в стерилизаторе паровом автоматическом при 121<sup>0</sup>С, 20 минут 1 атм (СПБА–75–I–НН, Россия).

Растения–регенеранты, полученные из каллусной ткани после 4 месяцев культивирования, для адаптации переносили на 10–15 суток в пластиковые горшочки, содержащие перлитовый песок. После этого растения пересаживали в горшочки со смесью торфа и песка в соотношении 3:1 и после в естественные полевые условия. Почву обрабатывали 0,1% раствором перманганата калия и препаратом «Фундазол», согласно инструкции для исключения грибной инфекции. Растения высаживали на расстоянии 15–20 см друг от друга, после чего на 4 сутки выращивания производили полив раствором Кноппа, в состав которого входили следующие компоненты (на 1000 мл): 1%-ный  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  8 мл; 5%-ный  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 4 мл; 10%-ный  $\text{KNO}_3$  – 2мл; 1%-ный  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 2мл; 10%-ный  $\text{KCl}$  – 1мл; 0,8%-ный Fe – лимоннокислый – 5 мл. Проводили контроль роста растений и выявление признаков заболеваний. Поддерживали разную температуру в зависимости от фазы роста: при высадке растений 14 – 16<sup>0</sup>С; при кущении и цветении растений – 20 – 24<sup>0</sup>С. Полив растений производили 3 раза в неделю в одно и то же время, равным количеством дистиллированной воды.

В качестве маркерных признаков акцентировали внимание на признаки цвета мякоти и окраски 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 количество белка. Содержание крахмала в клубнях картофеля проводили методом кислотного гидролиза (Ермаков А.И., 1972; Saqib A.N., 2011). Количество белка определяли по методу Лоури (Lowry O. H., 1951).

Для каждого варианта биохимического анализа использовали по одному клубню картофеля, измерения проводили в трех повторностях. Подсчет

количества белка и крахмала проводили относительно 100 г. сырой массы клубней и выражали в граммах и процентах, соответственно.

## **2.6. Инокуляция растений картофеля (*S. tuberosum* L.) PVS вирусом**

Для заражения мозаичным вирусом PVS<sup>0</sup> растения отбирали в возрасте 4–х недель в строгом соответствии сортовым особенностям с одинаковыми морфологическими признаками (высота растений, развитие листовых пластинок, вегетационная масса). Мозаичный PVS вирус картофеля (PVS<sup>0</sup>, DSMZ PV – 0838) был любезно предоставлен заведующим кафедрой «Биологии и биотехнологии» ЕНУ им. Л.Н. Гумилева, к.б.н., профессором PhD, Р.Т. Омаровым (Астана, Казахстан). Вирус PVS был выбран для инокуляции в качестве одного из наиболее распространенного картофельного вируса на территории СНГ и России, поражающего растения картофеля и приводя к большим экономическим потерям урожая (Киргизова И. В., 2016; Власов Ю. И., 2016).

Растения инокулировали через листовые пластинки при микроповреждении карборандумом и свежеприготовленной смесью вирусных частиц и фосфатного буфера. Растения контрольной группы обрабатывали той же смесью, но с отсутствием вирусных частиц. Заражение растений осуществляли инокуляцией двух листовых пластин у каждого растения на поверхности листовой пластины в объеме по 100 мкл инокуляционной смеси на одну листовую пластину. Инокуляционная смесь содержала 10мМ натрий – фосфатный буфер (pH 6,9 – 7,0 (pH метр, Consort C931, Бельгия) и карборандум (d=0,037 мм) в соотношении (1:3) (Amanbayeva, U. I., 2018).

Растения контрольной группы и искусственно зараженные растения картофеля выращивали в максимально приближенных условиях, изолированно друг от друга во избежание нарушения условий эксперимента.

## **2.7. Диагностика растений картофеля на наличие мозаичных вирусов методом иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографических экспресс-тестов (ИХА)**

Проведение ферментативной реакции проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (DAS-ELLISA). В лунки микротитровального планшета вносили очищенные поликлональные антитела к соответствующему вирусу разведенные в карбонатном буфере (pH 9,6) в соотношении (1:1000мкл) в количестве 200 мкл/лунку и выдерживали при температуре 4<sup>0</sup>С, 24 часа. Затем планшеты трижды промывали PBS – Tween, и вносили в лунки экстракционный сок анализируемых образцов картофеля, разбавленный в экстракционном буфере в соотношении 1:10 (0.1% твин – 20, 2.0% поливинилпирролидон (ПВП – 25), 0.2% овальбумин 0.01 М PBS) в концентрации 200 мкл/лунку. Выдерживали при температуре 4<sup>0</sup>С, 24 часа, после чего четырехкратно промывали PBS – Tween, вносили в лунки по 200 мкл конъюгированные вирусспецифические антитела на 3 ч., при температуре 37<sup>0</sup>С. Далее планшеты инкубировали со свежим субстратным буфером п-нитрофенилфосфата в течение 30 мин. при 25<sup>0</sup>С, в условиях темноты.

После этого проводили диагностику на иммуноферментном анализаторе (Labsystems Multiskan plus, фильтр 405 нм, Thermo Scientific, США) с использованием тест-систем на вирусы PVY, PVX, PVM, PVS, PLRV и контрольных положительных и отрицательных тест-планшетов, согласно инструкции производителя (Bioreba AG, Швейцария). Образцы растений картофеля считали зараженными вирусом, если значения были равны или близки к положительному контролю.

Диагностику ИХА проводили с использованием экспресс-тестов (AgriStrip set 100, Bioreba, Швейцария), согласно прилагаемой инструкции. В экстракционные пакеты с порами помещали растения картофеля для выделения клеточного сока, вносили 3000 мкл экстракционного буферного

раствора и проводили гомогенизацию. Затем 50 мкл экстракционного сока переносили в чистые одноразовые пластмассовые кюветы, вносили 150 мкл буферного раствора. В кюветы помещали тест-полоски (на 10 – 15 минут) и проводили визуальную идентификацию. При отрицательном результате диагностики проявлялась одна контрольная полоса, при положительном результате проявлялись две полосы – контрольная и тестовая полосы красного цвета. При высокой концентрации возбудителя проявлялась яркая окраска полос, при низкой концентрации – слабая интенсивность окраски. При отсутствии проявления полос на тесте, результат интерпретировался как недействительный.

## **2.8. Гомогенизация образцов растительного материала картофеля**

Гомогенизацию растительного материала (листья и стебли) картофеля осуществляли в фарфоровых ступках с пестиками на льду с внесением охлажденного экстракционного 50мМ К/Na – фосфатного буфера (рН 7,8) в отношении 1:2 (вес к объему).

Растительный гомогенат переносили в пробирки типа Эппендорф на 1,5 мл, затем добавляли фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) из расчета 20 мкл 100 мМ ФМСФ на 2 мл 50мМ К/Na – фосфатного буфера (Сибгатуллина, Г. В., 2011). Пробирки с гомогенатом центрифугировали при 11000 об/мин в течение 20 минут (Нодельман Е.К., 2014). Для экспериментов отбирался только супернатант, который переносился в новые пробирки без захвата осадка, для исключения загрязнения геля в области лунок и нарушения проходимости лунок.

## **2.9. Определение активности антиоксидантных ферментов картофеля**

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 (ГОСТ 8.229–81. ГСИ, 2019).

### 2.9.1. Определение активности растворимой пероксидазы

Определение активности пероксидазы осуществляли колориметрическим методом, который основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта его окисления при наличии перекиси водорода и пероксидазы (Ермаков А. И., 1987). Измерения проводили при длине оптической плотности 590 нм, ежесекундно в течение 120 секунд.

### 2.9.2. Определение активности каталазы

Определение активности каталазы проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм в течение 120 секунд, который основан на определении скорости разложения перекиси водорода исследуемого объекта с образованием кислорода и воды (Аebi Н., 1984).

Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции перекиси водорода ( $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) и выражали в  $\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$  белка.

### 2.9.3. Определение активности супероксиддисмутазы

Активность фермента SOD определяли по способности данного фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT) с некоторыми модификациями (Giannopolitis С. N., 1977; Polesskaya, O. G., 2004). 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 NBT.

## 2.10. Определение активности антиоксидантных ферментов у растений картофеля *in gel*

Разделение изоформ антиоксидантных ферментов каталазы и супероксиддисмутазы осуществляли методом нативного ПААГ-электрофореза белков в неденатурирующих условиях, на приборе Bio-Rad «Tetra cell Mini protein 3», США (Laemmli U. K., 1970; Mini-PROTEAN Tetra Cell BioRad, 2021). Для нативного фореа готовили разделяющий (12%) и концентрирующие гели (8%) (Гроздева Е.С., 2012; Weydert C.J., 2011). В состав электродного буфера (pH 8,8) входили 1,8 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис – HCl и 300 мМ глицина, в лунки вносили по 50 мкг белка для идентификации SOD, 20 мкг белка для CAT. Нативный фореа проводили в 7,5% полиакриламидном геле, в состав электродного буфера для определения изоформ пероксидазы (pH 8,3) входили 25 мМ Трис – HCl, 192 мМ глицина и 0,1% додецилсульфата натрия. Нативный электрофорез проводили при температуре 4°C, 2мА, 2ч. 20 минут.

### 2.10.1. Определение активности изоферментов каталазы *in gel*

Визуализацию активности фермента в нативном геле электрофореза проводили с использованием двухкомпонентного субстрата модифицированным методом предложенным J. M. Chandlee и J. G. Scandalios (Handlee J. M , 1983).

Гель после электрофореза промывали трижды в дистиллированной воде в течение 15 минут, инкубировали в 100 мл 0,03% раствора перекиси водорода в течение 10 минут при постоянном покачивании на шейкере (80 об/мин). 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, после чего гель промывали в дистиллированной воде (Woodbury W., 1971).

#### 2.10.2. Определение активности изоферментов пероксидазы *in gel*

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). Окрашивание проводили Кумаси R-250, гель сканировали и определяли относительные молекулярные массы белков с помощью программного обеспечения молекулярные массы ферментов были получены в результате обработки электрофереграммы с помощью программы BioCapt (разрешение 800 dpi) и Sigmagel (Vilber Lourmat). 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 (Bakalova S., 2004).

#### 2.10.3. Определение активности изоферментов супероксиддисмутазы *in gel*

Определение активности изоформ супероксиддисмутазы проводили согласно протоколу предложенному С.Н. Beauchamp и I. Fridovich (Beauchamp С.Н.,1971) с небольшими модификациями. Гель с исследуемыми образцами растений картофеля 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, далее гель с дистиллированной водой иллюминировали в гелъдокументирующей системе (Fusion–FX6–XT 820.WL/M) под УФ – облучением в течение 30 – 45 минут при температуре 20 – 25<sup>0</sup>С до появления бесцветных бэндв SOD на темно – фиолетовом фоне геля. Идентификацию изоформ ферментов SOD проводили путем обработки гелей в растворах ингибиторов 3 мМ KCN и 5 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за 30 мин до окрашивания. Изоформа Mn–SOD устойчива к обоим ингибиторам, Fe–SOD устойчива к KCN, но чувствительна к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, тогда как изоформа Cu/Zn–SOD чувствительна к обоим ингибиторам.

## 2.11. Статистический анализ

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).

## Глава III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 3.1. Обоснование выбора объектов исследований отечественных перспективных сортов картофеля г.Омск и Омской области

Выбор в качестве высокоурожайных и перспективных сортообразцов картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка был основан на проведенных маркетинговых исследованиях г. Омска и Омской области среди разных возрастных и социальных групп на основании опроса. Выбранные сорта отличаются разной сортовой восприимчивостью к мозаичным вирусам, поражающим растения картофеля, срокам созревания.

По результатам оценки спроса в 2020 – 2021г. (рис.10) среди 500 жителей, занимающихся выращиванием картофеля на своих подсобных участках, 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%.

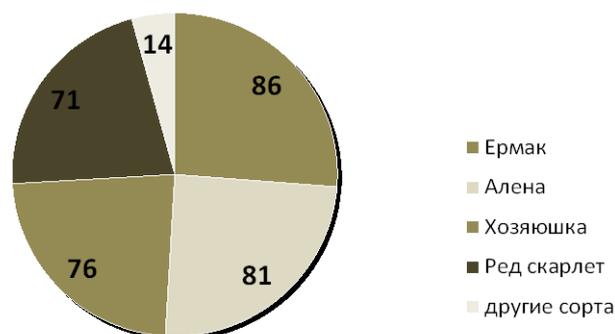


Рисунок 10. Востребованность сортов картофеля на территории г.Омска и Омской области среди населения разных возрастных групп (%)

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

### 3.2. 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. 4).

Таблица 4  
Состав питательных сред для получения каллусов картофеля *in vitro*

№ п/п	Компоненты	Питательные среды, мг/л					
		Контроль	№1	№2	№3	№4	№ 5
1	Макросоли МС	50	50	50	50	50	50
2	Микросоли МС	1	1	1	1	1	1
3	Fe–хелат МС	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
4	Тиамин НСl	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
5	Пиридоксин НСl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
6	Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
7	Мезоинозит	100	100	100	100	100	100
8	Глицин	2	2	2	2	2	2
9	Глютамин	25	25	25	25	25	25
14	Кинетин	0,25	0,25	0,25	0,25	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>
15	2,4–Д	–	1,0	2,0	3,0	<b>4,0</b>	<b>5,0</b>

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. 11).



Рисунок 11. Каллус картофеля с образованием глобулярных структур

Наиболее интенсивно каллусогенез происходил на питательной среде №5 с добавлением 5 мг/л 2,4 – Д и 0,25 мг/л кинетина (Рис. 12).

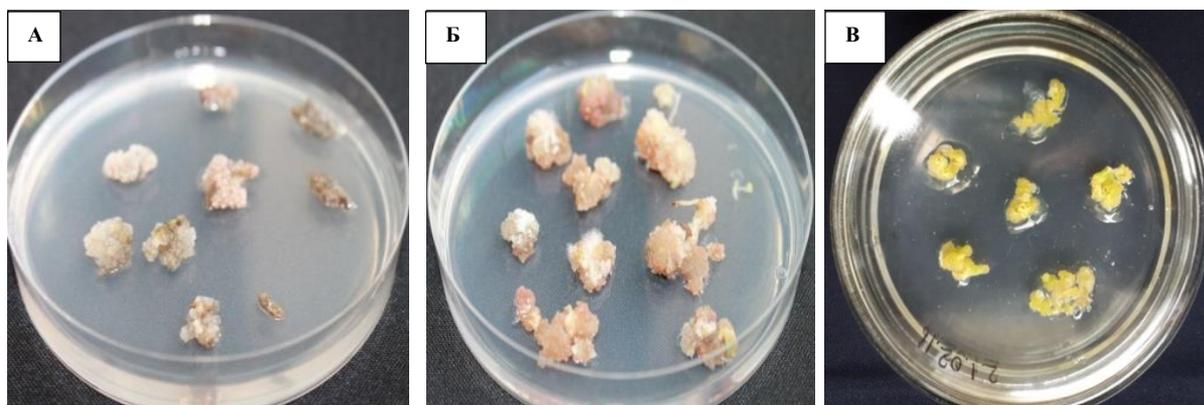


Рисунок 12. Каллусные культуры, индуцированные из листовых эксплантов сортов картофеля Ермак (А), Алена (Б) и Хозяюшка (В) на 15 сутки культивирования.

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. 13).

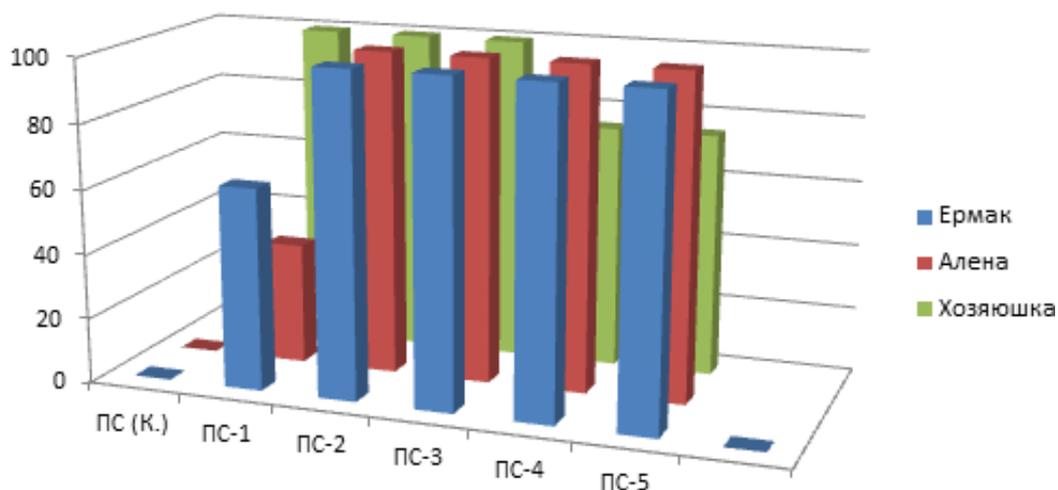


Рисунок 13. Каллусообразующая способность картофеля в зависимости от состава питательной среды у сортов картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка

В таблице 5 представлены данные по количеству листовых эксплантов способных образовывать каллусную ткань, исходному количеству первичных эксплантов и каллусообразующей способности в зависимости от гормонального состава питательной среды.

При изучении каллусообразующей способности разных типов первичных эксплантов картофеля (листовых и стеблевых), отмечена более низкая способность к каллусообразованию у стеблевых эксплантов у всех изучаемых сортов картофеля по сравнению с листовыми эксплантами. Данные о каллусообразующей способности разных первичных эксплантов картофеля представлены в таблице 5.

Таблица 5

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

№ п/п	Наименование сорта картофеля	Каллусообразующая способность, %	
		Листовые Экспланты	Стеблевые Экспланты
1	Ермак	<b>100,0</b>	48,0±4,0
2	Алена	<b>95,0±2,0</b>	60,0±5,0
3	Хозяюшка	<b>85,0±2,0</b>	61,0±5,0

В таблице 6 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.

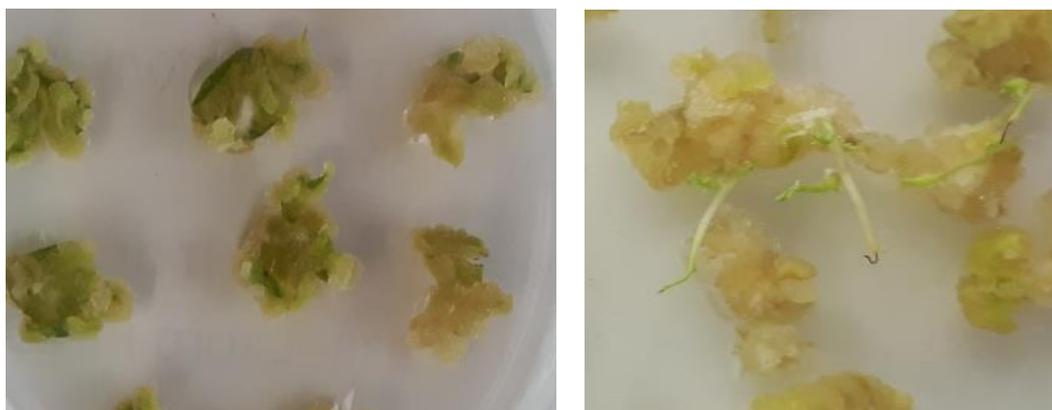
Таблица 6

Каллусообразующая способность картофеля в зависимости от состава питательной среды

№ п/ п	Концентрация 2,4-Д, мг/л	Исходное количество эксплантов, шт.			Количество эксплантов индуцировав- ших каллус, шт			Каллусо- образующая способность, %		
		Ермак	Алена	Хозяюшка	Ермак	Алена	Хозяюшка	Ермак	Алена	Хозяюшка
1	<b>МС (Контроль)</b>	32	32	32	–	–	–	–	–	–
2	<b>П-1 (1мг/л)</b>	32	32	32	20	12	32	62,5	37,5	100
3	<b>ПС-2 (2мг/л)</b>	32	32	32	32	32	32	100	100	100
4	<b>ПС-3 (3мг/л)</b>	32	32	32	32	32	32	100	100	100
5	<b>ПС-4 (4мг/л)</b>	32	32	32	32	32	24	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>75</b>
6	<b>ПС-5 (5мг/л)</b>	32	32	32	32	32	24	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>75</b>

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. 14, А, В).



А

В

Рисунок 14. 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.

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

Из морфогенных каллусных культур, были получены растения–регенеранты картофеля, свободные от вирусных инфекций, в количестве 150 растений каждого сорта. В **Приложении 7**, представлены результаты диагностики полученных растений – регенерантов картофеля омских сортов картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка методом ИФА на базе испытательной лаборатории «Отдела биотехнологии и иммунодиагностики» ФГБНУ ВНИИКХ, которые подтвердили отсутствие мозаичных вирусов картофеля.

В результате экспериментов был подобран состав питательной среды для культивирования растений–регенерантов картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка.

За основу минерального состава использовали питательную среду по прописи МС с дополнительным внесением феруловой кислоты и кинетина. На рисунках 15, 16, 17 представлены растения – регенеранты, изучаемых сортов.



Рисунок 15. Регенеранты, полученные из меристематической каллусной ткани сорта Ермак



Рисунок 16. Регенеранты, полученные из меристематической каллусной ткани сорта Алена



Рисунок 17. Регенеранты, полученные из меристематической каллусной ткани сорта Хозяюшка

Метод клонального микроразмножения картофеля *in vitro* сибирских сортов картофеля Ермак, Алена были внедрены в научно – производственной лаборатории «Микроклонального размножения растений» ЗАО ТПК «Элита–картофель» и использованы при получении элитного посадочного материала картофеля в виде семенного материала высших репродукций (**Приложение 2**).

Результаты диссертационной работы были внедрены на базе ФГБОУ ВО «Омского государственного технического университета» при подготовке лекционных и практических занятий (**Приложение 1**).

Результаты диссертационной работы были внедрены на базе ООО «Элита» при получении каллусов и выращивании растений – регенерантов картофеля в условиях аэропонной установки (**Приложение 3**).

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.

### 3.4.Соматоклональные 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 рисунке 18 представлены растения – регенеранты картофеля выращиваемые в горшочной культуре.

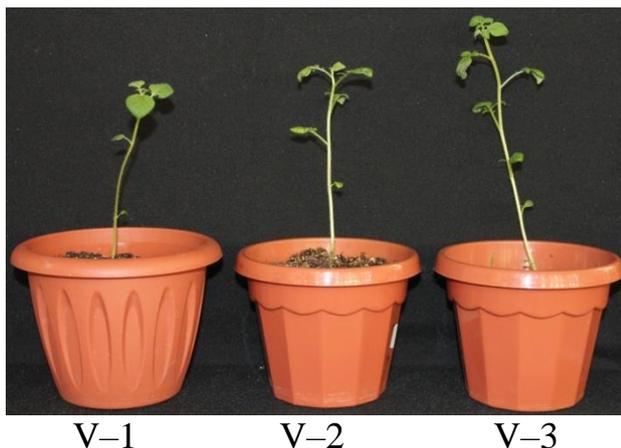


Рисунок 18. Растения – регенеранты картофеля выращиваемые в горшочной культуре с автоклавированной почвой (14 сутки): V-1 – сорт Ермак, V- 2 – сорт Хозяюшка, V- 3 – сорт Алена.

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. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, которые показали, что именно цветок характеризуется очень слабой изменчивостью, так как он относится к наиболее консервативным органам картофеля (Леонова Н. С., 2010).

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 рисунке 19 представлены клубни картофеля второй репродукции, полученные от соматоклональных образцов картофеля.

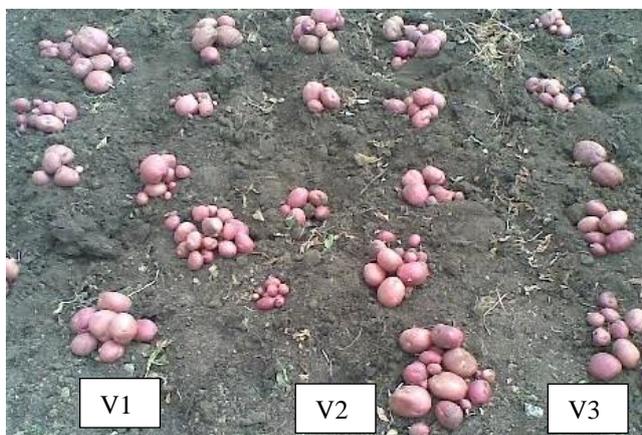


Рисунок 19. Клубни картофеля второй репродукции:

V–1 – соматоклональные образцы картофеля, полученные от сорта Ермак,  
V– 2 – соматоклональные образцы картофеля, полученные от сорта Хозяюшка,  
V– 3 – соматоклональные образцы картофеля, 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.

На рисунке 20 представлены результаты тестирования картофеля, отобранных на основании морфологических отличий на общее содержание крахмала в клубнях второй репродукции. Согласно данным, полученным в ходе исследования, среди образцов клубней картофеля соматоклональных линий наблюдалась вариабельность по содержанию крахмала.

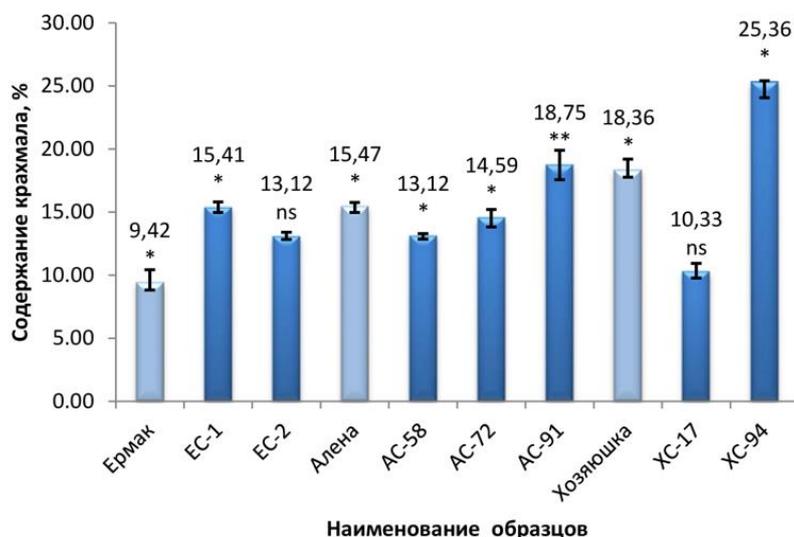


Рисунок 20. Общее содержание крахмала в клубнях картофеля, где голубые столбцы Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматклона, соответствующего сорта; синие столбцы ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94 – соматклональные образцы картофеля. Звездочки на графике “\*” – указывают на значительную ( $P < 0.05$ ); “\*\*” – очень значительную ( $P < 0.001$ ) и “ns” – незначительную ( $P > 0.05$ ) разницу в содержании крахмала в клубнях между контрольными сортами и соматклональными вариантами. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения ( $\pm SD$ ) при помощи графического редактора ImageJ

Отобранные на основании отличительных морфологических признаков соматклональные 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 превышали контрольное значение. Необходимо 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 анализируемых раннеспелых, среднеспелых сортов и гибридов по содержанию крахмала максимальное значение было отмечено у среднеспелых сортов картофеля Гранат – 17,9%, Криница – 19,6%, а также у гибрида 22009 – 16,6% (Бурлов С. П., 2019). В наших исследованиях также условно, что наибольшее количество крахмала содержал среднеспелый сорт картофеля Хозяюшка (18,2%) и его соматоклональный 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. Согласно данным, представленным на рисунке (Рис. 21) у образцов картофеля среднеспелого сорта Хозяюшка и его соматоклонов по содержанию белка, было отмечено повышенное содержание белка по сравнению с ранними сортами Ермак и Алена.

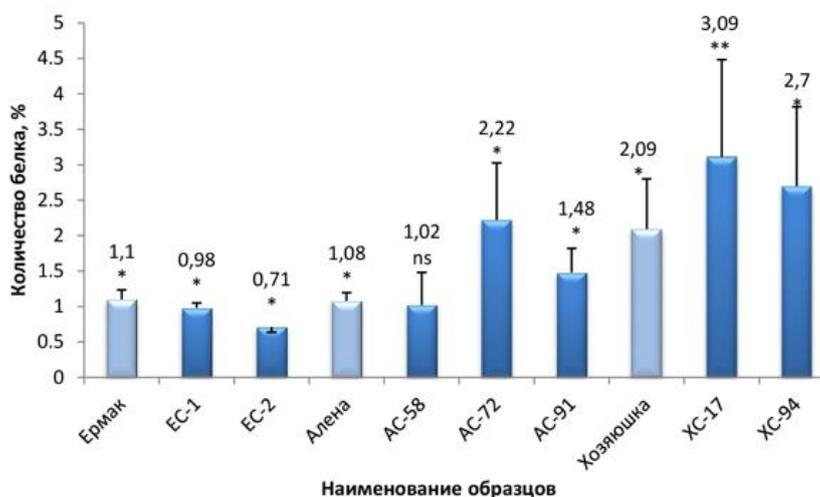


Рисунок 21. Общее содержание белка в клубнях, где голубые столбцы Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматоклона,

соответствующего сорта; синие столбцы ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94 – соматклональные образцы картофеля. Звездочки на графике “\*” – указывают на значительную ( $P < 0.05$ ); “\*\*” – очень значительную ( $P < 0.001$ ) и “ns” – незначительную ( $P > 0.05$ ) разницу в содержании белка в клубнях между контрольными сортами и соматклональными вариантами. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения ( $\pm SD$ ) при помощи графического редактора ImageJ

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.

### 3.4. Инокуляция растений вирусной инфекцией

Проведена инокуляция растений картофеля штаммом вируса PVS<sup>0</sup> 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. 22).

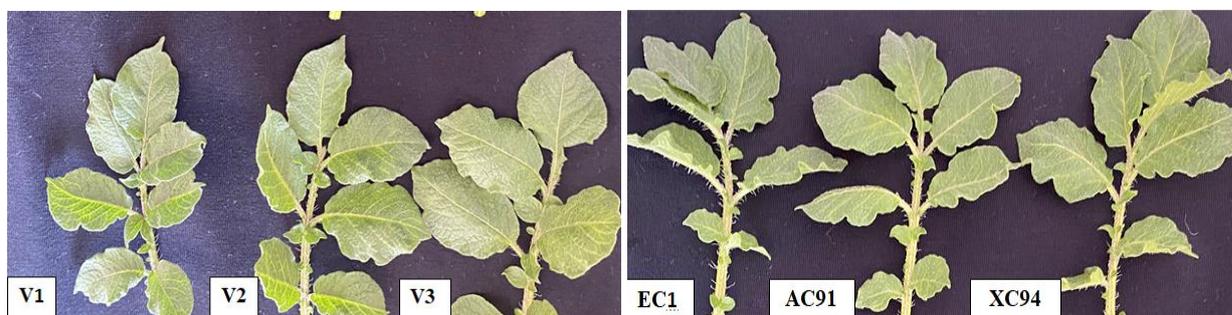


Рисунок 22. Инфицированные растения картофеля с отсутствием проявления признаков развития инфекции: V1 – сорт Ермак, V2– сорт Алена, V3– сорт Хозяюшка; EC1, AC91, XC94 – соматоклональные образцы картофеля

Результаты успешного инфицирования растений картофеля вирусом PVS<sup>0</sup>, были подтверждены экспресс – диагностикой ИХА. На рисунке 23 представлены результаты ИХА тестов (Bioreba, AgriStrip), которые позволили отобрать инфицированные растения.



Рисунок 23. Диагностика ИХА инфицированных растений картофеля вирусом PVS<sup>0</sup>

Для достоверности полученных результатов, отобранные растения после ИХА диагностики были проверены с помощью ИФА. Результаты тестирования растений картофеля представлены в таблице 7.

Таблица 7

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 плотность Пробы	Положительный Контроль	Отрицательный Контроль	Вирус(+/-)
1	2	3	4	5
<b>PVX</b>				
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	–
<b>PVY</b>				
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	–
<b>PVS</b>				
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	+
<b>PVM</b>				
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	–
<b>PLRV</b>				
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	–

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. В **Приложении 8** представлены результаты диагностики растений картофеля омских сортов картофеля методом ИФА на базе испытательной лаборатории «Отдела биотехнологии и иммунодиагностики» ФГБНУ ВНИИКХ, которые подтвердили наличие вируса PVS у инфицированных растений, которые были использованы для дальнейшей серии экспериментов.

### **3.6. Определение активности антиоксидантных ферментов картофеля**

В результате определения активности системы антиоксидантной защиты картофеля среди разных сортов по устойчивости к вирусным инфекциям, были отмечены различия в активности среди инфицированных и здоровых растений. В таблице 8 представлены средние значения активности ферментов антиоксидантной системы: POX, SOD и CAT.

Определение активности антиоксидантных ферментов проводили у трех сортов сибирского картофеля: устойчивого к вирусной инфекции сорта Хозяюшка, умеренно устойчивого сорта Алена и чувствительного сорта картофеля Ермак в результате инфицирования (И) и у инфицированных растений контрольной группы (К), при  $\pm$  – стандартной ошибки, NS – незначительной, S – значительной при  $P \leq 0,05$ .

Активность антиоксидантных ферментов была различной среди инфицированных и здоровых растений контрольной группы, в отношении фермента CAT наиболее значительное повышение активности при инфицировании по сравнению с контрольными растениями отмечали у чувствительного к вирусным инфекциям сорта картофеля Ермак и умеренно устойчивого сорта картофеля Алена.

Активность антиоксидантных ферментов картофеля при инфицировании вирусом PVS с помощью дисперсионного анализа

Наименование сорта	Наименование ферментов					
	CAT		POX		SOD	
	К	И	К	И	К	И
<b>Хозяюшка</b>	16,25±1,25	18,75±2,2 NS	2,0±0,25	4,5±0,25 NS	2,5±0,5	5,5±0,5S
<b>Алена</b>	12,5 ±1,25	16,25±1,25S	1,5±0,0	2,75±0,00 S	7,0±0,5	7,5±0,9 NS
<b>Ермак</b>	5,0±1,25	8,75±1,25 S	1,5±0,0	0,75±0,00 S	3,5±0,5	3,5±0,5NS

В отношении фермента POX наиболее значительные изменения наблюдали у сорта Хозяюшка (в 2 раза) по сравнению с контрольными здоровыми растениями. У сорта Алена отмечали изменение активности фермента POX в сторону увеличения, в то время как, у сорта Ермак изменения активности фермента отмечали в сторону уменьшения активности по сравнению с контрольной группой. Активность SOD была наиболее выражена у сорта Хозяюшка по сравнению с контрольными растениями и другими изучаемыми генотипами картофеля. Сорт Алена продемонстрировал незначительное увеличение активности SOD, в то время как у сорта Ермак не отмечали изменений в ферментативной активности SOD по сравнению с контролем.

### 3.7. 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.

Исследования показали, что у микроклонов сорта Хозяюшка ХС–94 прослеживалось увеличение уровней РОХ, по сравнению с контрольной группой растений (Рис. 24).

Активность фермента рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции восстановленного аскорбата ( $2,8\text{мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ ) и выражали как мкМ АК/мин·мг белка.

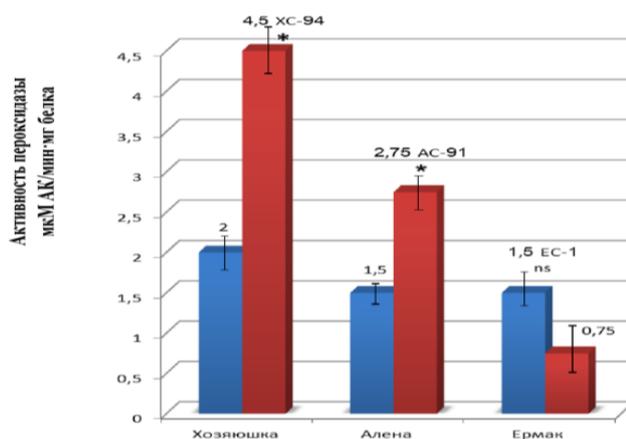


Рисунок 24. Определение общей активности РОХ картофеля при инфицировании вирусом PVS<sup>0</sup>, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматоклона соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматоклональными вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Данные с 4–х независимых повторов были преобразованы в числовые ( $\pm\text{SD}$ ) при помощи графического редактора ImageJ. Звездочки “\*” на графике указывают на значительную ( $P < 0,05$ ); “ns” – незначительную ( $P > 0,05$ ) разницу в активности РОХ между контрольными и микроклонами

Следует отметить, что у инфицированных вирусной инфекцией растений картофеля общий уровень активности фермента пероксидазы повышался по сравнению с контрольной группой растений. 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 рисунка 24, 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<sup>(NTN)</sup> (Milavec M., 2008). Причем, в исследованиях авторов Kogovsek P., Pompe–Novak M. отмечено, что у чувствительных сортов картофеля Igor и Nadine наблюдали различия в экспрессии генов, отвечающих за активацию антиоксидантных ферментов после инфицирования, а также в период развития симптомов вирусной инфекции. У данных сортов картофеля отмечался различный специфический ответ на изоляты одного вируса картофеля, т.е. растения картофеля способны распознавать и по–разному реагировать на изоляты вируса (Pompe–Novak, M., 2006; Kogovsek P., 2008; Kogovsek P., 2010; Kogovsek P., 2011).

Полученные результаты согласуются с работами по определению активности РОХ в ранних ответных реакциях у отличающихся по восприимчивости сортов картофеля в ответ на инфицирование вирусом Y<sup>(NTN)</sup> проводимыми учеными M. Milavec, K. Gruden. 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 PVS<sup>0</sup> по сравнению с контролем.

За весь период эксперимента активность растворимых пероксидаз коррелировала с вирусной инфекцией. В исследованиях Milavec M. отмечено повышение активности POX у восприимчивого сорта картофеля Igor по сравнению с контролем, но гораздо медленнее и менее интенсивнее по сравнению с устойчивыми сортами Pentland Squire и Sante. Нами отмечена большая активность пероксидаз у среднеспелого сорта картофеля Хозяюшка, обладающего умеренной устойчивостью к фитовирусам, 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.

### **3.8. 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.

У опытной группы растений картофеля, инфицированных вирусом, уровень активности фермента САТ отличался общим повышением активности при сравнительном анализе с контрольными растениями, что согласуется с исследованиями ученых Колычихина М.С., Белошапкина О.О., Kaur, G., Sharma S. (Колычихина М.С., 2021; Kaur G., 2020). Активность САТ мы рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции перекиси водорода ( $40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) и выражали как  $\text{mM H}_2\text{O}_2/\text{мин} \cdot \text{мг}$  белка. На рисунке 25

представлена общая активность каталазы у сортов картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка.

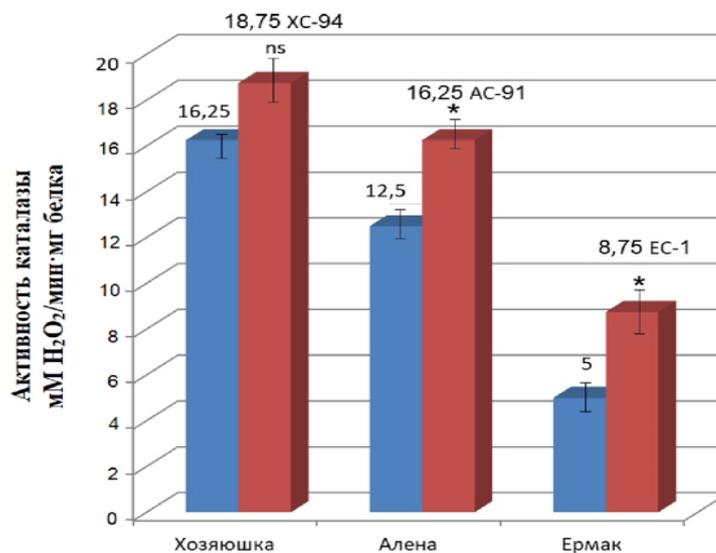


Рисунок 25. Определение общей активности САТ картофеля при инфицировании вирусом PVS<sup>0</sup>, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматклона соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматклональными вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Данные с 4–х независимых повторов были преобразованы в числовые ( $\pm$ SD) при помощи графического редактора ImageJ. Звездочки “\*” на графике указывают на значительную ( $P < 0,05$ ); “нс” – незначительную ( $P > 0,05$ ) разницу 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 (мМ Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>/мин·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. Исследования показали различную активность фермента у устойчивых, умеренноустойчивых и восприимчивых сортов в ответ на инфицирование вирусом.

В наших исследованиях отмечена большая активность фермента у восприимчивого и умеренноустойчивого сортов картофеля по сравнению с устойчивым сортом картофеля. Показатели активности у всех изучаемых сортов были выше по сравнению с контролем. 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 PVS<sup>0</sup>. 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.

### **3.9. 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. 26).

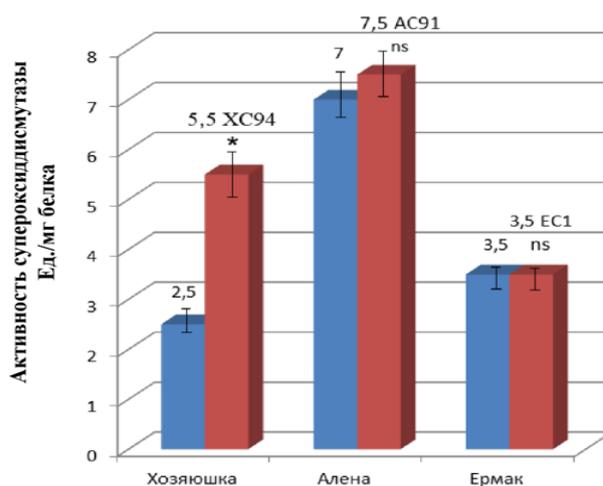


Рисунок 26. Определение общей активности SOD картофеля при инфицировании вирусом PVS<sup>0</sup>, где синим цветом на графике обозначены столбцы с сортами картофеля Ермак, Алена, Хозяюшка – контроль для каждого соматоклона соответствующего сорта; красным цветом на графике обозначены столбцы с соматоклональными вариантами ЕС–1 полученного от сорта Ермак, АС–91 от сорта Алена, ХС–94 – от сорта Хозяюшка. Данные с 4–х независимых повторов были преобразованы в числовые ( $\pm$ SD) при помощи графического редактора ImageJ. Звездочки “\*” на графике указывают на значительную ( $P < 0,05$ ); “ns” – незначительную ( $P > 0,05$ ) разницу в активности SOD между контрольными сортами и микроклонами

Как показывают данные рисунка 26, изменения в активности SOD у исследуемых сортов и микроклонов картофеля, зафиксированные после инфицирования вирусом PVS<sup>0</sup>, 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.

Полученные результаты согласуются с данными научных трудов El. Komy, M.H. Saleh, A.A. Ibrahim, Y.E. Li, G. Zhang, X. Zhang, S.K. El-DougDoug N.C. по определению ферментативной активности SOD у разных по восприимчивости сортов картофеля в ответ на биотический стрессор, которые также демонстрируют более высокие уровни активности фермента у устойчивых сортов (El. Komy M.H., 2020; Li G., 2018; El-DougDoug N., 2020).

### 3.10. 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. 28).

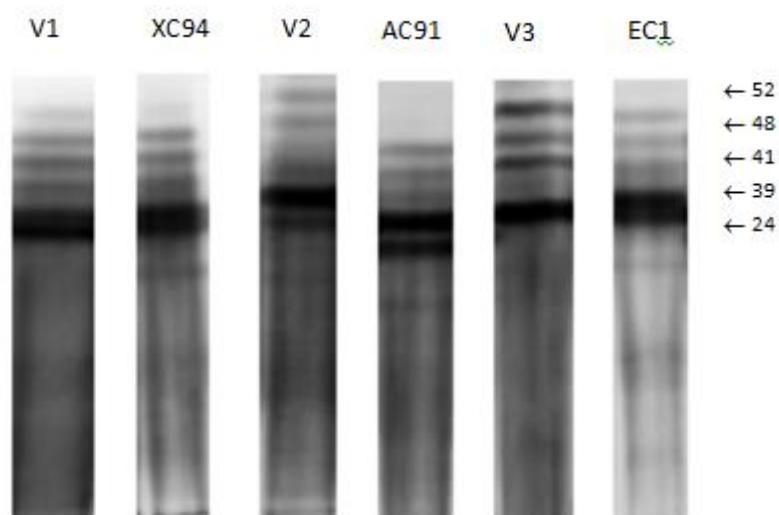


Рисунок 28. Определение изоферментного спектра POX картофеля где, V1–Хозяюшка, V2–Алена, V3–Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы; XC–94, AC–91, ЕС–1, образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений. Обозначения: 52, 48, 39, 24 (кДа) – молекулярные массы изопероксидаз, 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 9 представлены данные по количеству изоформ РОХ у растений картофеля инфицированных микроклонов и контрольных растений.

Таблица 9

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 вирусом, 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.

Согласно результатам исследований И.А.Грасковой и полученных результатов по определению активности изоформ ферментов РОХ у картофеля, отличающегося по восприимчивости к вирусной инфекции отмечается разная активность изоферментного состава. 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 соматоклонального образца происходила активация изоферментов, 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 соматоклона ЕС-1 относительно контроля, но при этом наблюдался синтез дополнительной формы фермента, что возможно связано с отличием характеристик у полученного соматоклонального образца картофеля и исходного сорта Ермак, чувствительного к вирусным и бактериальным инфекциям. Предполагается, что у полученного соматоклонального 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.

### **3.11. 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 (Willekens H., 1994; Frugoli J.A., 1996; 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. 29).

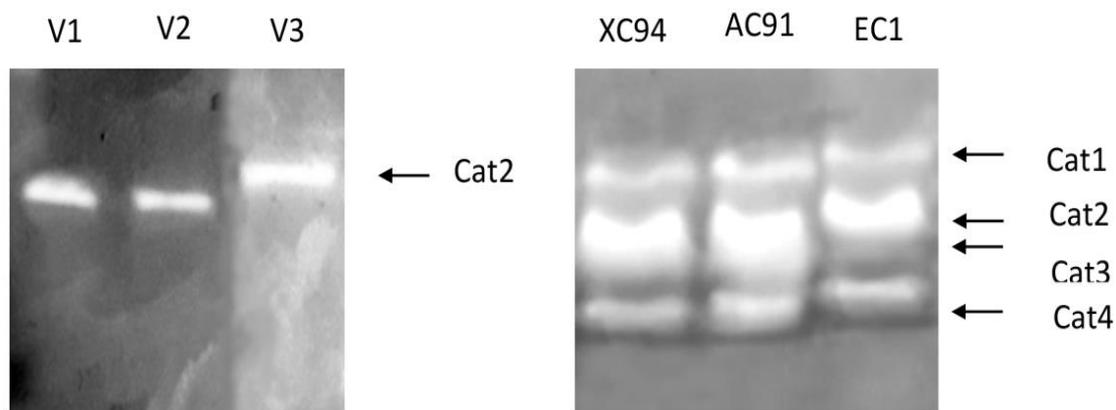


Рисунок 29. Определение *in gel* активности изоформ САТ картофеля где, V1–Хозяюшка, V2–Алена, V3–Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы; XC–94, AC–91, EC–1, образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений; Cat1–Cat 4 – изоферменты САТ

Она была отнесена к САТ класса 1 в соответствии с данными литературы, основанных на сравнения структуры генов между *Zea mays*, *Oryza sativa* и *Nicotiana tabacum*. Кроме того, в литературе было показано, что, активность САТ класса 1 составляет большую долю общей активности фермента, поэтому в нашей работе полосу с активностью в контрольной группе растений мы отнесли к классу 1 и обозначили ее как – Cat1 (Anium N.A., Sharma P., Gill S.S.). В частности, класс I наиболее распространен в фотосинтезирующих тканях, которые удаляют избыток  $H_2O_2$ , образующийся при фотодыхании. 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 EC–1 была обнаружена четвертая форма каталазы, которая условно обозначена как Cat3. 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 соматональных образцов относительно контроля. Однако, при этом наблюдали синтез дополнительной формы фермента (Cat3, 54 кДа), что возможно связано с отличием характеристик у полученного соматонального 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).

### **3. 12. Определение активности супероксиддисмутазы *in gel***

В результате экспериментов по определению активности SOD *in gel* выявлены в микроклонах две изоформы фермента: Fe- и Cu/Zn-SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования защитного иммунитета растений (Рис.30).

Изоформа S1, которая не ингибировалась KCN и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.

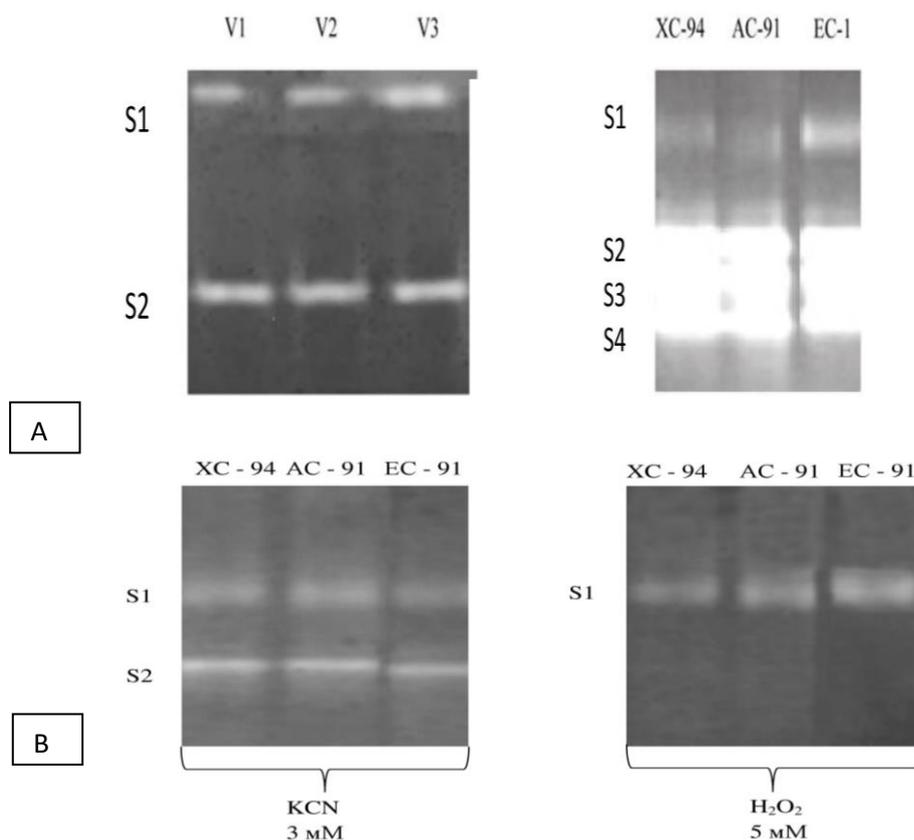


Рисунок 30. Определение *in gel* активности изоформ SOD картофеля:

**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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, где, S1 – изоформа Mn-SOD, S2 – изоформа Fe-SOD.

Кроме того, у соматоклонов картофеля, зараженных вирусной инфекцией, наблюдали появление двух изоформ супероксиддисмутазы – S3 и S4. Эти изоформы были отнесены к Cu/Zn-SOD на основании исчезновения белковых полос при высоких концентрациях KCN (3 мМ) или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 мМ). Изоформы S3 и S4 проявляли интенсивную окраску на геле, что свидетельствовало об их активности. Из полученных данных по определению изоферментного состава супероксиддисмутаз 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

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 пассируемой 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 ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Аветисов, В. А. Генотипические особенности морфогенеза в каллусных культурах различных сортов картофеля / В. А. Аветисов, О. С. Мелик–Саркисов // Сельскохозяйственная биология. – 1985. – № 3. – С. 67–70.
2. Айтбаев, Т. Е. Создание банка отечественных штаммов вирусов картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов: метод. указания / Т. Е. Айтбаев, В. К. Швидченко, В. Т. Хасанов, В. В. Мазурок // КАТУ им. С. Сейфуллина. – Астана. – 2009. – 52 с.
3. Александров, М.Ю. Сорт картофеля Алена. Выписка из реестра ФГБУ «Госсорткомиссия» [Электронный ресурс]: – URL: file:///C:/Users/Acer/Downloads/reestr–ALENA.pdf (дата обращения: 25.02.2022).
4. Анисимов, Б.В. Сорта картофеля, возделываемые в России : Каталог. Ежегодное справочное издание / Б. В. Анисимов, С. Н. Еланский, В. Н. Зейрук [и др.] ; Российская академия сельскохозяйственных наук, Всероссийский научно–исследовательский институт картофельного хозяйства имени А. Г. Лорха, Всероссийский научно–исследовательский институт фитопатологии, Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. – Москва : Агроспас, 2013. – 144 с. – ISBN 978–5–904610–06–7.
5. Артюхова, С. И. Биотехнология оздоровления Сибирского картофеля от вирусов / С. И. Артюхова, И. В. Киргизова ; Омский государственный технический университет. – Омск : федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Омский государственный технический университет", 2015. – 136 с. – ISBN 978–5–8149–2183–3.
6. Балакина, А. А. Изучение активности ферментов антиоксидантной системы на различных этапах культивирования люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) *in vitro* / А. А. Балакина, Ю. В.

Кунина, А. А. Терентьев, Е.А. Калашникова // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2012. – № 1 (2). – С. 78 – 83.

7. Бараненко, В. В. Супероксиддисмутаза в клетках растений / В. В. Бараненко // Цитология. – 2006. – Т. 48, № 6. – Р. 465 – 475.

8. Бердникова, О. С. Воздействие гипоксии и среды высоких концентраций CO<sub>2</sub> на образование активных форм кислорода в клетках различных по устойчивости растений : специальность 03.01.04 : дис. ... канд. биол. наук / О. С. Бердникова. – Воронеж, 2016. – 170 с.

9. Бурлов, С. П. Итоги научных исследований по технологии производства высококачественного семенного материала картофеля в условиях Иркутской области / С. П. Бурлов, Н. И. Большешапова // Современное состояние и перспективы инновационного развития обработки почвы в Восточной Сибири : Мат. Всеросс. науч.– практич. конф., посвященной 90–летию памяти научной школы по проблеме обработки почвы в Восточной Сибири: Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского. – 2019. – С. 19 – 37.

10. Вальдеррама Ромеро, А. С. Особенности каллусогенеза у эксплантов картофеля, изолированных из листьев на среде с 2,4–Д в культуре *in vitro* / А. С. Вальдеррама Ромеро, М. Ю. Чередниченко, М. В. Высоцкая [и др.] // Аллоцитоплазматическая пшеница и некоторые аспекты биотехнологии растений. – Москва : 2002. – С. 66–73.

11. Власов, Ю. И. Сельскохозяйственная фитовирусология / Ю. И. Власов, Э. И. Ларина, Э. В. Трускинов. – СПб. : ВИЗР, 2016 – С. 196 – 199.

12. Галеева, Л. А. Оценка уровня антиокислительных ферментов и железа, меди, марганца в клетках картофеля, инфицированных *Phytophthora infestans* : специальность 03.00.07 : дис. ... канд. биол. наук / Л. А. Галеева. – Казань, 2009. – 118 с.

13. Гарифзянов, А. Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А. Р. Гарифзянов, Н. Н. Жуков, В. В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. –

2011. – № 2. – URL: <http://www.science–education.ru/ru/article/view?id=4600>  
(дата обращения: 13.07.2020).

14. Гарифзянов, А. Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений / А. Р. Гарифзянов, Н. Н. Жуков, В. В. Иванищев // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 2. – URL: <https://www.science–education.ru/ru/article/view?id=4600>  
(дата обращения: 17.10.2019).

15. Гарифзянов, А. Р. Образование и физиологические реакции активных форм кислорода / А. Р. Гарифзянов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2. – URL: <https://science–education.ru/ru/article/view?id=4600> (дата обращения: 24.02.2021).

16. ГОСТ 17227 – 71. рН – метрия, таблетки для приготовления рабочих буферных растворов : изд. офиц. : утв. и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 14 окт. 1971 г. № 173 : дата введ. 1973–01–01. – М. : Изд–во стандартов, 1980. – 5 с.

17. ГОСТ 29105.1 – 91. Исходные микрорастения из меристем. Технические условия : изд. офиц. : утв. и введен в действие Приказом Федер. агентства по техническому регулированию и метрологии от 01 янв. 1992 г. № 697–ст : введ. впервые : дата введ. 1991–19–27. – М. : Комитет стандартизации и метрологии СССР, 1991. – 15 с.

18. ГОСТ 29267 – 91. Картофель семенной. Оздоровленный исходный материал. Приемка и методы анализа: изд. офиц. : утв. и введен в действие Приказом Федер. агентства по техническому регулированию и метрологии от 01 сент. 2014 г. № 697–ст : введ. впервые : дата введ. 1993–01–01. – М.: Стандартиформ, 2010. – 15 с.

19. ГОСТ 8.229–81. ГСИ. Спектрофотометры инфракрасные. Методы и средства проверки: изд. офиц. : утв. и введен в действие Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и

сертификации по переписке (протокол от 27 декабря 2013 г. N 63–П– ст : введ. впервые : дата введ. 2015–01–01. – М. : Стандартиформ, 2019. – 15 с.

20. ГОСТ Р ЕН 12297– 2012. Биотехнология. Оборудование. Методы контроля приспособленности к стерилизации : изд. офиц. : утв. и введен в действие Приказом Федер. агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 нояб. 2012 г. № 697–ст : введ. впервые : дата введ. 2013–12–01. – М. : Стандартиформ, 2012. – 15 с.

21. Граскова, И.А. Роль слабосвязанных с клеточной стенкой пероксидаз в устойчивости растений к биотическому стрессу: специальность 03.00.12: дис. ... докт. биол. Наук / И.А. Граскова. – Иркутск., 2008. – 394 с.

22. Граф, Н. Клубень проблем / Н. Граф // Российская газета – Экономика Сибири. – 2014. – № 0 (6472). – URL: <https://rg.ru/2014/09/04/reg-sibfo/kartofel.html> (дата обращения: 16.10.2017).

23. Граф, Н. Клубень проблем / Н. Граф // Российская газета – Экономика Сибири. – 2014. – № 0 (6472). – URL: <https://rg.ru/2014/09/04/reg-sibfo/kartofel.html> (дата обращения: 16.10.2017).

24. Граф, Н. Клубень проблем. Российская газета – Экономика Сибири №0(6472). – Омск. – URL: <https://rg.ru/2014/09/04/reg-sibfo/kartofel.html>.

25. Гроздева, Е. С. Практикум по генетической инженерии и молекулярной биологии растений : учеб. пособие / Е. С. Гроздева, Е. В. Дейнеко, А. А. Загорская [и др.]. – Томск : ТГУ, 2012. – С. 59 – 61

26. Демчук, И. Почему вырождаются сорта картофеля / И. Демчук // К земле с любовью. – 2011. – № 1 (42). – URL: <http://journizisk.livejournal.com/3215.html> (дата обращения: 06.10.2017).

27. Дергачева, Н. В. Потенциал среднеспелых сортов картофеля селекции "Омского АНЦ" в условиях Западной Сибири / Н. В. Дергачева, С. В. Согуляк // Сборник мат-лов Всеросс. (национальной) науч.–практич конф. посвящ. 100–летию со дня рождения С. И. Леонтьева. – Омск: ОмГАУ им. П.А. Столыпина. – 2019. – С. 162 – 167.

28. Дергачева, Н. В. Характеристика новых сортов картофеля селекции СибНИИСХ / Н. В. Дергачева, С. В. Согуляк // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – №5. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-novyh-sortov-kartofelya-selektcii-sibniish> (дата обращения: 11.02.2022).
29. Дорожкин, Б. Н. Новый среднеспелый столовый нематодоустойчивый сорт картофеля Хозяюшка / Б. Н. Дорожкин, Н. В. Дергачева // Научное обеспечение картофелеводства Сибири и дальнего востока: состояние, проблемы и перспективные направления : Междунар. науч. – практич. конф. – Кемерово: Кузбассвуиздат" – 2006. – С. 66–70.
30. Еланский, С. Н. Сорта картофеля, допущенные к использованию в России в 2016 году / С. Н. Еланский, Е. М. Чудинова // 2016. – URL: [http://www.kartofel.org/cultivars/main\\_cult/sorta.htm](http://www.kartofel.org/cultivars/main_cult/sorta.htm) (дата обращения: 26.05.2022).
31. Ергалиев, Т. М. Влияние вирусного белка супрессора на ферменты окислительного стресса : специальность 6D060700 : дис. ... д – ра РнД / Т. М. Ергалиев. – Астана, 2016. – 93 с.
32. Ермаков А.И. Методы биохимического исследования растений // Ленинград: Колос, 1972 – С. 367 – 370.
33. Ермаков, А. И. Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков, В. В. Арасимович, Н. П. Ярош. – Л. : Агропромиздат, 1987. – 428 – 432 с.
34. Журавлева Е.В., Фурсов С.В. Картофелеводство как одно из приоритетных направлений Федеральной научно–технической программы развития сельского хозяйства на 2017–2025 годы // Картофель и овощи. – 2018. – № 5. – С. 6 – 9
35. Захаренкова, Т.С. Антагонистические взаимодействия патогенного гриба и растения в инфекционной капле, связанные с активацией кислорода : специальность 03.01.05 : дис. ... канд. биол. наук / Т. С. Захаренкова. – М., 2011. – 146 с.

36. Зыкин, А. Г. Вирусные болезни картофеля / А. Г. Зыкин. – Л. : Колос, 1976. – 151 с.
37. Иванов, А. Знаменитый сорт картофеля Ермак – характеристика, особенности выращивания и другие нюансы. [Электронный ресурс]: – 2022. – URL: <https://na-mangale.ru/kartofel-ermak.html> (дата обращения: 26.03.2022).
38. Ишеева, О. Д. Ферменты первичной защиты от окислительного стресса у вакуолей клеток растений : специальность 03.01.05 : дис. ... канд. биол. наук / О. Д. Ишеева. – Иркутск, 2010. – 162 с.
39. Калашникова, Е. А. Клеточная инженерия растений : учебник и практикум для вузов / Е. А. Калашникова. – 2-е изд. – Москва : Издательство Юрайт, 2020. – 333 с. – (Высшее образование). – ISBN 978-5-534-11790-5. – Текст : электронный // Образовательная платформа Юрайт [сайт]. – URL: <https://urait.ru/bcode/448580> (дата обращения: 20.02.2022).
40. Калашникова, Е. А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е. А. Калашникова, Е. З. Кочиева, О. Ю. Миронова. – М. : КолосС, 2006. – 144 с.
41. Калашникова, Е.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к грибным болезням : специальность 03.00.23 : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Калашникова Елена Анатольевна. – Москва, 2003. – 54 с.
42. Келдыш, М. А. Вирусы, вириды и микоплазмы растений : К. 34 : учеб. пособие / М. А. Келдыш, Ю. И. Помазков. – М. : Изд-во РУДН, 2003. – 157 с.
43. Киемова, З. С. Биохимические особенности антиоксидантных систем разнотолерантных к соли генотипов картофеля *in vitro* : специальность 03.01.04 : дис. ... канд. биол. наук / З. С. Киемова. – Душанбе, 2013. – 101 с.
44. Киргизова, И. В. Индукция каллусных культур картофеля *Solanum tuberosum* / И. В. Киргизова // Научно-технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего : сб. материалов V

Междунар. науч.–практ. конф., 7 апр. 2017 г. – Кемерово : ЗапСибНЦ, 2017 – Т. 1. – С. 28 – 31.

45. Киргизова, И. В. Основные фитопатогенные вирусы картофеля, распространенные на территории Омска и Омской области / И. В. Киргизова // Динамика систем, механизмов и машин. – 2016. – Т. 4, № 1. – С. 374 – 378.

46. Киргизова, И. В. Особенности накопления антиоксидантных ферментов у картофеля в условиях биотического и абиотического стресса / И. В. Киргизова, А. М. Гаджимурадова, Р. Т. Омаров. – DOI: <http://dx.doi.org/10.21285/2227-2925-2018-8-4-42-54> // Прикладная химия и биотехнология. – 2018. – Т. 4, № 4. – С. 42 – 54.

47. Кирилова, Н.В. Ферменты антиоксидантной системы культивируемых растительных клеток : специальность 03.00.04 : дис. ... д-ра биол. наук / Н. В. Кириллова. – СПб., 2000. – 439 с.

48. Киру С. Д., Рогозина Е. В. Мобилизация, сохранение и изучение генетических ресурсов культивируемого и дикорастущего картофеля / Вавиловский журнал генетики и селекции . – 2017. – Т.21. – №1. – С.7 – 15. – DOI 10.18699/VJ17.219.

49. Коллектив авторов. Советы садоводам. Западно – Сибирское книжное издательство. Омск. 1979 – URL: <https://domorost.ru/maps/country/rossiya/region/omskaya-oblast/type/soil> (дата обращения: 12.01.2022).

50. Колупаев, Ю. Е. Активные формы кислорода в растениях при действии стрессоров: образование и возможные функции / Ю. Е. Колупаев // Вестник Харьковского национального аграрного университета. Сер. Биология. – 2007. – Вып. 3 (12). – С. 6 – 26.

51. Колычихина, М.С. Изменение урожайности картофеля под воздействием вирусных заболеваний / М.С. Колычихина, О.О. Белошапкина, С. Фири // Серия конференций ИОР: Наука о Земле и окружающей среде.– ИОР Publishing, 2021. – Т. 663. – №. 1. – С. 012035.

52. Костина, Л.Н. К 80 – летию мировой коллекции картофеля ВИР (Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции). – СПб.: ВИР. – 2007. Т. 163. – С.55 – 81.

53. Леонова, Н. С. Изменчивость в культуре картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* и возможности ее использования в селекции и семеноводстве : специальность 03.01.06 "Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)" : автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук / Леонова Нина Семеновна. – Улан-Удэ, 2010. – 32 с.

54. Макарова, С.С. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы / С. С. Макарова, В. В. Макаров, М. Э. Тальянский, Н. О. Калинина. – DOI 10.18699/VJ17.224 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – № 21 (1). – С. 62 – 73.

55. Максимов, И. В. Про/антиоксидантная система и устойчивость растений к патогенам / И. В. Максимов, Е. А. Черепанова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – С. 250 – 61.

56. Минибаева, Ф. В. Активные формы кислорода и ионная проницаемость плазмалеммы в растительных клетках при стрессе : специальность 03.00.12 : дис. ... д-ра биол. наук / Ф. В. Минибаева. – Казань, 2005. – 287 с.

57. Министерство сельского хозяйства и продовольствия Омской области: официальный сайт. – Омск. – URL: <https://omskportal.ru/novost?id=/oiv/msh/2021/06/22/01> (дата обращения: 19.01.2022). – Текст: электронный.

58. Минсельхоз России. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2016 году // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. – № 2 (20). – С. 2 – 10.

59. Мякишева, Е. П. Новые особенности процесса клонального микроразмножения сорта картофеля селекции Западной Сибири / Е. П. Мякишева, О. К. Таварткиладзе, Д. А. Дурникин // Биологический вестник

Мелитопольского государственного педагогического университета им. Богдана Хмельницкого. – 2016. – Т. 6. – С. 375 – 389.

60. Несов, А. В. Активные формы кислорода в гибели клеток растений : специальность 03.01.05 : дис. ...канд. биол. наук / А. В. Несов. – М., 2013. – 126 с.

61. Нодельман, Е. К. Применение гена Fe– зависимой супероксиддисмутазы для защиты хлоропластов растений томата и табака от окислительного стресса : специальность 03.01.06 : дис. ...канд. биол. наук / Е. К. Нодельман. – М., 2013. – 105 с.

62. Нодельман, Е. К. Применение гена Fe–зависимой супероксиддисмутазы для защиты хлоропластов растений томата и табака от окислительного стресса : специальность 03.01.06 : дис. ... канд. биол. наук / Е. К. Нодельман ; Всерос. науч.–исслед. ин–т с.–х. биотехнологии РАСХН. – М., 2014. – 133 с.

63. Официальный сайт ООО ТПК «Элита – картофель». 2022. – URL: <https://tpk-elita.ru/> (дата обращения: 21.01.2022).

64. Панкратова, И. Картофель Алена : характеристика и особенности выращивания сорта [Электронный ресурс]: – URL: <https://fermer.blog/bok/ogorod/kartofel/sorta-kartofelya/ranniy-kartofel/7056-kartofel-alena.html>. (дата обращения: 25.02.2022).

65. Петров, П. Д. Хозяюшка – картофель для всех регионов [Электронный ресурс]: – 2017. – URL: <https://dizajn-sada.ru/gryadki/kozyayushka-kartofel-dlya-vsex-regionov> (дата обращения: 24.03.2022).

66. Погода и климат: справочник. – 2022. – URL: <http://www.pogodaiklimat.ru/climate/28698.htm> (дата обращения: 12.01.2022).

67. Полесская, О. Г. Растительная клетка и активные формы кислорода / О. Г. Полесская. – М. : КДУ, 2007. – 140 с.

68. Полухин А.А., Панарина В.И., Шабалкина Н.А. Тенденции развития селекции и семеноводства в России в условиях реализации

политики импортозамещения на ресурсных рынках // Вестник ОрелГАУ. 2020. №4 (85). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tendentsii-razvitiya-selektsii-i-semenovodstva-v-rossii-v-usloviyah-realizatsii-politiki-importozamesheniya-na-resursnyh-rynках> (дата обращения: 25.01.2022).

69. Почвы Омской области: справочник. – 2022. – URL: <https://domorost.ru/maps/country/rossiya/region/omskaya-oblast/type/soil>

70. Правительство РФ. ФНТП о проекте «Стратегия развития селекции и семеноводства в России». Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017 – 2025 годы Основные документы [Электронный ресурс]: – URL : docs.wixstatic.com/ugd/22d4d9\_8f5ad4de0fe74a6f9e3c9cae1be12b19.pdf. (дата обращения: 10.10.2021).

71. Радюкина, Н. Л. Функционирование антиоксидантной системы дикорастущих видов растений при кратковременном действии стрессоров : специальность 03.01.05 : дис. ... д-ра биол. наук / Н. Л. Радюкина. – М., 2015. – 200 с.

72. Решетников, В.Н. Сравнение активности морфогенеза длительно пассируемых каллусных культур *Nicotiana Tabacum* / В.Н. Решетников, Т.И. Фоменко, Л.Г. Бердичевец, М.К. Малюш // Клеточные ядра и пластиды растений: биохимия и биотехнология: Мат-лы Междунар. конф. – Минск, Беларусь : УП «Технопринт». – 2004. – С. 200 – 209.

73. Рогозина Е.В. Широко распространенные и потенциально опасные для российского агропроизводства возбудители вирусных болезней картофеля / Е. В. Рогозина, Н. В. Мироненко, О. С. Афанасенко, Ю. Мацухито // Вестник защиты растений. – 2016. – № 4 (90). – С. 24 – 33.

74. Рогозина, Е. В. Широко распространенные и потенциально опасные для российского агропроизводства возбудители вирусных болезней картофеля / Е. В. Рогозина, Н. В. Мироненко, О. С. Афанасенко, Ю. Мацухито // Вестник защиты растений. – 2016. – № 4 (90). – С. 24 – 33.

75. Рогозина, Е.В. Мозаичные вирусы картофеля, поражающие растения клубненосных видов рода *Solanum* L. в полевом генном банке ВИР/ Е.В. Рогозина, Н.В. Мироненко, Н.А. Чалая, Ю. Мацухита, Х. Янагисав // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – №23. – С.304–311 DOI 10.18699/VJ19.495
76. Росинформагротех. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т.1. «Сорта растений» (официальное издание). М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2021. – 719 с.
77. Росинформагротех. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т.1. Сорта растений ( Официальное издание ) М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019. – 516 с.
78. Севоян В.А., Картофель Ермак. [Электронный ресурс]: – 2022. – URL: <https://fermilon.ru/sad-i-ogorod/ovoshhi/kartofel-ermak.html> (дата обращения: 26.02.2022).
79. Сибгатуллина, Г. В. Методы определения редокс – статуса культивируемых клеток растений : учеб.–метод. пособие / Г. В. Сибгатуллина, Л. Р. Хаертдинова, Е. А. Гумерова [и др.]. – Казань : КФУ, 2011. – С. 54 – 58.
80. Сидякин, А. И. Индуцированный морфогенез *in vitro* и накопление тритерпеновых гликозидов в каллусных культурах ломоноса виноградолистного (*Clematis vitalba* L.) : специальность 03.00.20 : дис. ... канд. биол. наук / А. И. Сидякин. – Симферополь. – 2011. – 217 с.
81. Спиридонов, И. Вечерний Омск [Максим ЧЕКУСОВ: «Нам не нужен заморский картофель»] / И. Спиридонов // Экономика. – 2021. – 27 марта. – С. 1– 5. – URL : <https://omskgazeta.ru/rubrika/economy/maksim-chekusov-nam-ne-nuzhen-zamorskiy-kartofel/>.
82. Толмачева, И. А. Научно–технологические основы оздоровления сортов картофеля от вирусов в условиях Приамурья : специальность 06.01.05 : дис. ... канд. с.–х. наук / И. А. Толмачева. – Хабаровск, 2001. – 134 с.

83. Федоренко, В.Ф. Зарубежный и отечественный опыт разработки и применения мер и инструментов поддержки развития селекции и семеноводства картофеля [Электронный ресурс] Информационный отчет / ФГБНУ «Росинформагротех»; Федоренко В.Ф., Мишуров Н.П., Кузьмин В.Н., Голубев И.Г., Королькова А.П., Неменушая Л.А., Чавыкин Ю.И., Францкевич В.С., Федоров А.Д. – Электрон. текстовые дан. (2 Мбайт). – Правдинский, 2018 – [https://rosinformagrotech.ru/images/pdf/otchet\\_kartofel\\_2018.pdf](https://rosinformagrotech.ru/images/pdf/otchet_kartofel_2018.pdf), свободный. – Загл. с экрана
84. Храмцов, Ю. Ставка на картофель. – URL: <https://zen.yandex.ru/media/id/5d32d9dff0d4f400acf82698/stavka-na-kartofel-5de5df2895aa9f00b1a4d828> (дата обращения: 16.07.2020).
85. Храмцова, И. Ф. Сорта сельскохозяйственных культур селекции ФГБНУ «Омский АНЦ» / И. Ф. Храмцова // Омск : Изд-во ИП Макшеевой Е. А., 2018. – 176 с. : ил.
86. Чекусов, М. Журнал 100% успеха в Омске. Ставка на картофель. – 2019. – URL: <https://zen.yandex.ru/media/id/5d32d9dff0d4f400acf82698/stavka-na-kartofel-5de5df2895aa9f00b1a4d828> (дата обращения: 21.01.2022).
87. Черемисин А. И., Дергачева Н. В., Шмайлова Ю. С. Селекционная и семеноводческая работа по картофелю в Омской области // Достижения науки и техники АПК. 2008. №12. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/selektionnaya-i-semenovodcheskaya-rabota-po-kartofelyu-v-omskoy-oblasti> (дата обращения: 25.01.2022).
88. Черемисин, А. Аналитический научно – производственный журнал «Агротайм»: картофелеводство. Омская наука готовится к серьезному прорыву. – 2018. – № 12.(62).– URL: <https://agrotime.info/kartofelevodstvo-omskaja-nauka-go/> (дата обращения : 23.01.2022).

89. Черемисин, А.И. Картофель Алена: Омский аграрный научный центр [Электронный ресурс]: –2022. – URL: <https://anc55.ru/kart/kartofel-aljona/>. (дата обращения: 25.02.2022).
90. 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: тез. докл. XI Междунар. конф. (Минск, 23–27 сент. 2018 г.) / Национальная академия наук Беларуси ; Центральный ботанический сад [и др.]. – Минск: Медисонт, 2018. – С. 272 – 273.
91. Широков, А.И. Основы биотехнологии растений / Широков А.И., Крюков Л.А. // Электронное учебно–методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – С.33 – 35.
92. Шукурова, М. Х. Рост, микроклубнеобразование и активность ферментов у устойчивых к засолению генотипов картофеля *in vitro*: специальность 03.01.05 : дис. ... канд. биол. наук / М. Х. Шукурова. – Душанбе, 2011. – 94 с.
93. Экология: справочник. – 2015. – URL: <http://ru-ecology.info/term/9058/> (дата обращения: 12.10.2019).
94. Aebi, H. Catalase *in vitro* / H. Aebi. – DOI:10.1016/S0076–6879(84)05016–3 // Meth. Enzymol. Methods in Enzymology. – 1984. – Vol. 105. – P. 121 – 126.
95. Aghaei K. Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes/ K. Aghaei, A. A.Ehsanpour, S. Komatsu // J Integr Plant Biol. – 2009. – Vol.51. – no. 12. – P. 1095 – 103. – doi: 10.1111/j.1744–7909.2009.00886.x. PMID: 20021557.
96. Allen, R. D. GenBank accession No X62077 Use of transgenic plants to study antioxidant defenses / R. D. Allen, R. Webb, S. A. Schake // Free Radical Biology and Medicine. – 1997. – Vol. 23, no. 3. – P. 473 – 479.

97. Almagro, L. Class III peroxidases in plant defence reactions / L. Almagro [et al.] // *Journal of experimental botany*. – 2008. – Vol. 60, no. 2. – P. 377 – 390.
98. Alscher, R. G. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants / R. G. Alscher, Neval Erturk, S. Lenwood // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – Vol. 53, no. 372. – P. 1331 – 1341.
99. Amanbayeva, U. I. Antioxidant enzyme activities of plants under conditions of combined temperature and viral stress / U. I. Amanbayeva, A. Z. Bekturova, Z. B. Tleukulova // *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen 2019)*. – ACS Omega. – T.2. – 2018. – P. 28 – 28.
100. An, Y. Effects of mechanical damage and herbivore wounding on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolism and antioxidant enzyme activities in hybrid poplar leaves / Y. An, Y. Shen, Z. Zhang // *Journal of Forestry Research*. – 2009. – Vol. 20, no. 2. – P. 156 – 160.
101. Anderson, P. K. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers / P. K. Anderson [et al.] // *Trends in Ecology & Evolution*. – 2004. – Vol. 19, no. 10. – P. 535 – 544.
102. Anjum, N. A. Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes / N. A. Anjum [et al.] // *Protoplasma*. – 2014. – Vol. 251, no. 6. – P. 1265 – 1283.
103. Ara, N. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species “*Cucurbita maxima*” and “*Cucurbita moschata*” and their interspecific inbred line “Maxchata” / N. Ara // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – Vol. 14, no. 12. – P. 24008–24028.
104. Asada, K. The water – water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons / K. Asada // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 50. – P. 601–639.

105. Asada, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons / K. Asada // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 50. – P. 601 – 639.
106. Asada, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons / K. Asada // *Annual review of plant biology.* – 1999. – Vol. 50, no. 1. – P. 601 – 639.
107. Anium N.A., Sharma P., Gill S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhar K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofo // *Environ. Pollut Res.*, 2016, pp.19002–19029.
108. Bakalova, S. Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by stress and ABA during germination of wheat seeds / S. Bakalova, A. Nikolova, D. Nedeva // *Bulg. J. Plant Physiol.* – 2004. – Vol. 30 (1–2). – P. 64 – 77.
109. Bannister, W. H. Evolutionary aspects of superoxide dismutase: the copper/zinc enzyme / W. H. Bannister [et al.] // *Free Radical Research Communications.* – 1991. – Vol. 12, no. 1. – P. 349 – 361.
110. Baxter, A. ROS as key players in plant stress signalling / A. Baxter, R. Mittler, N. Suzuki // *Journal of experimental botany.* – 2013. – Vol. 65, no. 5. – P. 1229–1240.
111. Beauchamp, C. H. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels / C. H. Beauchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem.* – 1971. – Vol. 44. – P. 276 – 287.
112. Benevides M. P. Relationship between antioxidant defense system and salt tolerance in *Solanum tuberosum* / M. P. Benevides, P. L. Marconi, S. M. Gullego [et al.] // *Aust. J. Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 27. – P. 273 – 278.
113. Benikhlef , L Perception of soft mechanical stress in *Arabidopsis* leaves activates disease resistance / L. Benikhlef [et al.] // *BMC plant biology.* – 2013. – Vol. 13, no. 1. – P. 133.

114. Berni, R. Reactive oxygen species and heavy metal stress in plants: Impact on the cell wall and secondary metabolism / R. Berni [et al.] // *Environmental and experimental botany*. – 2019. – Vol. 161. – P. 98 – 106.
115. Blokhina, O. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review / O. Blokhina, E. Virolainen, K. V. Fagerstedt // *Ann. Botan.* – 2003. – Vol. 91. – P. 179 – 194.
116. Bowler, C. Superoxide dismutase and stress tolerance / C. Bowler, M. V. Montagu, D. Inze' // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 43. – P. 83e116.
117. Brand, M. D. Mitochondrial superoxide production, biological effects, and activation of uncoupling proteins / M. D. Brand, C. Affourtit, T. C. Esteves [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2004. – Vol. 37. – P. 755 – 767.
118. Chandlee, J. M. Gene expression during early kernel development in *Zea mays* / J.M. Chandlee, J.G. Scandalios // *Developmental genetics*. – 1983. – Vol. 4. – P. 99-115.
119. Chen, T. F. Selenium–induced changes in activities of antioxidant enzymes and content of photo–synthetic pigments in *Spirulina platensis* / T. F. Chen, W. J. Zheng, Y. S Wong, F. Yang // *J. Integr. Plant Biol.* – 2008. – Vol. 50. – P. 40 – 48.
120. Choudhury, S. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress / S. Choudhury [et al.] // *Plant signaling & behavior*. – 2013. – Vol. 8, no. 4. – P. e23681.
121. Corpas, F. J. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells / F. J. Corpas, J. B. Barroso, L. A. del Rio // *Trends in Plant Science*. – 2001. – Vol. 6 (4). – P. 145 – 150.
122. Corpas, F.J. Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms // *Free Radical Research*. – 1999. – Vol.31. – P. 235–241.

123. Correa – Aragunde, N. Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells: regulation of ascorbate peroxidase as a case study / N. Correa–Aragunde, N. Foresi, L. Lamattina // Journal of experimental botany. – 2015. – Vol. 66, no.10. – P. 2913–2921.
124. Dangl, J. L. Plant pathogens and integrated defence responses to infection / J. L. Dangl, J. D. G. Jones // Nature. – 2001. – Vol. 411 (6839). – P. 826.
125. Dar, M. I. An introduction to reactive oxygen species metabolism under changing climate in plants / M. I. Dar [et al.] // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. – Springer, Singapore, 2017. – P. 25–52.
126. Dar, M. I. An Introduction to Reactive Oxygen Species Metabolism Under Changing Climate in Plants / M. I. Dar // Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. – Springer, Singapore, 2017. – P. 25 – 52.
127. Dar, M. I. Responses of antioxidative defense system and composition of photosynthetic pigments in *Brassica juncea* L. upon imidacloprid treatments / M. I. Dar, F. A. Khan, F. Rehman // Abiotic and Biotic Stress Journal. – 2015. – Vol. 1, no.1. – P.3 – 15.
128. Das, K. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS – scavengers during environmental stress in plants / K. Das, A. Roychoudhury // Redox Homeostasis Managers in Plants under Environmental Stresses. – 2016. – 53 pp.
129. Daudi, A. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern–triggered immunity / A. Daudi [et al.] // The Plant Cell. – 2012. – Vol. 24, no. 1. – P. 275 – 287.
130. Daurov, D. Determining effective methods of obtaining virus – free potato for cultivation in kazakhstan / Daurov, D., Daurova A., Karimov A., Tolegenova D., Volkov D. // American Journal of Potato Research. 2020. – URL: <https://doi.org/97.10.1007/s12230-020-09787-z> (дата обращения: 12.12.2020).

131. Del Río, L. A. ROS and RNS in plant physiology: an overview / L. A. Del Río // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – Vol. 66, no.10. – P. 2827–2837.
132. Dietz, K. J. Recent progress in understanding the role of reactive oxygen species in plant cell signaling / K. J. Dietz, R. Mittler, C. Noctor // *Plant physiology*. – 2016. – Vol. 171, no. 3. – P. 1535 – 1539.
133. El. Komy, M.H. Early production of reactive oxygen species coupled with an efficient antioxidant system play a role in potato resistance to late blight. / El. Komy, M.H., Saleh, A.A., Ibrahim, Y.E. et al. // *Trop. plant pathol.* 2020. Vol.45. – P. 44–55. – URL: <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00318-8> (дата обращения: 16.07.2021)
134. Elaleem, K. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration in tuber segment culture of potato (*Solanum tuberosum L.*) cultivar Diamant / M. M. Khalafalla, K. G. A. Elaleem, R. S. Modawi // *African journal of biotechnology*. – 2009. – Vol. 8. – no. 11. – P. 234 – 241.
135. El-DougDoug, K. A. Monitoring variability responses of cultivated potato varieties infected with Potato virus Y pepper isolate // *Egyptian J. Virol.* – 2014. – Vol.. 11. – P. 82 – 101.
136. Evans D. A., Sharp W. R., Medina Filho H. P. Somaclonal and gametoclonal variation // *American Journal of Botany*. – 1984. – T. 71. – №. 6. – P. 759 – 774.
137. Faize, M. Involvement of cytosolic ascorbate peroxidase and Cu/Zn – superoxide dismutase for improved tolerance against drought stress / M. Faize [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 62, no. 8. – P. 2599 – 2613.
138. Faize, M. Cytosolic ascorbate peroxidase and Cu, Zn–superoxide dismutase improve seed germination, plant growth, nutrient uptake and drought tolerance in tobacco / M. Faize [et al.] // *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 27. – №. 3–4. – P. 215 – 226.

139. Food and Agricultural Organization of the United Nations; Statistic Division. – URL: FAO home page <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (дата обращения: 03.07.2020).
140. Foyer, C. H. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a reevaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context / C. H. Foyer, G. Noctor // *Plant, Cell & Environment*. – 2005. – Vol. 28, no. 8. – P. 1056 – 1071.
141. Foyer, C. H. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism / C. H. Foyer, B. Halliwell // *Planta*. – 1976. – Vol. 133. – P. 21–25.
142. Foyer, C. H. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses / C. N. Foyer, G. Noctor // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, no. 7. – P. 1866 – 1875.
143. Fridovich, I. Superoxide dismutases / I. Fridovich // *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. – 1986. – Vol. 58, no. 6. – P. 61–97.
144. Frugoli, J. A. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. / Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R. // *Plant Physiol*. – 1996. – V. 112. – P. 327 – 336.
145. Gapińska, M. Effect of short–and long–term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots / M. Gapińska, M. Skłodowska, B. Gabara // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2009. – Vol. 30, no. 1. – P. 11.
146. Gechev, T. S. Reactive oxygen species as signals (that modulate plant stress responses and programmed cell death / T. S. Gechev, F. Van Breusegem, J. M. Stone [et al.] // *BioEssays/ Wiley Periodicals Inc*. – 2006. – Vol. 28. – P. 1091–1101.
147. Gechev, T. S. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death / T. S. Gechev, F. Van Breusegem, J.

M. Stone [et al.] // BioEssays / Wiley Periodicals Inc. – 2006. – Vol. 28. – P. 1091–1101.

148. Ghaffoor, A. G. Potato (*Solanum tuberosum* L.) for production of *in vitro* response of potato. Virus free plantlets. / A. G. Ghaffoor, K. Shah // J. Bio. Sci. – 2003. – Vol. 1. – P. 898–899.

149. Giannopolitis, C. N. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants / C. N. Giannopolitis, S. K. Ries. – DOI: 10.1104/pp.59.2.309 // Plant Physiol. – 1977. – Vol. 59. – P. 309 – 314.

150. Gill, S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S. S. Gill, N. Tuteja // Plant physiology and biochemistry. – 2010. – Vol. 48, no. 12. – P. 909 – 930.

151. Gill, S. S. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants / S. S. Gill, N. Tuteja // Plant physiology and biochemistry. – 2010. – Vol. 48, no. 12. – P. 909 – 930.

152. Giraud, E. Giraud, E. The absence of Alternative Oxidase 1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress / E. Giraud // Plant physiology. – 2008. – Vol. 147, no.2. – P. 595 – 610.

153. GraphPad Prism User Guide. GraphPad Software Inc. – URL: [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (дата обращения: 20.06.2022.)

154. Grob, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence response / F. Grob, J. Durner, F. Gaupels // Frontiers in plant science. – 2013. – Vol. 4. – P. 1 – 13.

155. Gutierrez, P. A. Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia / P. A. Gutierrez, J. F. Alzate, M. A. Marin–Montoya. – DOI: 10.1007/ s00705–012–1289–8 // Arch. Virol. – 2013. – Vol.158, no.10. – P.2205 – 2208.

156. Halliwell, B. Oxygen is a toxic gas—an introduction to oxygen toxicity and reactive oxygen species / B. Halliwell // Free radicals in biology and medicine. – 1999. – Vol. 31 . – P. 651 – 669.

157. Handlee, J. M. Gene expression during early kernel development in *Zea mays* / J. M. Handlee, J. G. Scandalios // *Dev. Genet.* – 1983. – Vol. 4. – P. 99 – 115.
158. Hernandez J. A. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences / J. A. Hernandez, A. Jimenez, P. Mullineaux, F. Sevilla // *Plant Cell Environ.* – 2000. – Vol. 23. – P. 853 – 862.
159. Hernandez, J. A. Salt induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria / J. A. Hernandez, F. J. Corpas, L. A. Gomez, L. A. del Rio // *Plant Physiol.* – 1993. – Vol. 89. – P. 103 – 110.
160. Ho, T. T. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures / T. T. Ho, H. N. Murthy, S. Y. Park // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2020. – Vol. 21, no. 3. – P. 716 – 720.
161. Huang, A. Reactive oxygen species regulate auxin levels to mediate adventitious root induction in *Arabidopsis* hypocotyl cuttings / A. Huang, Y. Wang, Y. Liu [et al.]. – DOI: 10.1111/jipb.12870 // *J. Integr. Plant Biol.* – 2020. – Vol. 62. – P. 912 – 926.
162. Hull, R. *Plant virology* / R. Hull // Academic press. – 2013. – P. 888–925. URL: [https://books.google.kz/books?hl=ru&lr=&id=PYrZAAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=NIPR-H8SW&sig=BO606rCW4W3J9fO5XQtYJAxIjq4&redir\\_esc=y#v=snippet&q=risk%20as%20a%20virus%20reservoir%20for%20other%20crops&f=false](https://books.google.kz/books?hl=ru&lr=&id=PYrZAAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=NIPR-H8SW&sig=BO606rCW4W3J9fO5XQtYJAxIjq4&redir_esc=y#v=snippet&q=risk%20as%20a%20virus%20reservoir%20for%20other%20crops&f=false) (дата обращения: 12.05. 2021).
163. Hull, R. *Plant Virology* / R. Hull // UK: Academic press. – 2013. – Vol. 5. – P.1006 – 1008.
164. Hurst, A. Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C3/CAM

intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. / A. Hurst, T. Grams, R. Ratajczak // Plant, Cell & Environ. – 2002. – Vol. 27. – P. 187 – 197.

165. Hussain M. et al. Potato protein: An emerging source of high quality and allergy free protein, and its possible future based products // Food Research International. – 2021. – T. 148. – P. 110583.

166. [Hussain M.](#) Potato protein: An emerging source of high quality and allergy free protein, and its possible future based products / [Hussain M.](#), [Qayum A.](#), [Xiuxiu Z.](#), [Hussain K.](#) // [Food Research International](#). – 2021. – V.148. – P. 110583.

167. Hussain, S. Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions / S. Hussain // Plant Abiotic Stress Tolerance. – Springer, Cham, 2019. – P. 207 – 219.

168. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Master Species List #35. – Germany, 2019. – URL: [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/241/betaflexiviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/241/betaflexiviridae) (дата обращения: 25.06.2020).

169. Ishikawa, T. The role of plant Bax inhibitor-1 in suppressing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death / T. Ishikawa, H. Uchimiya, M. Kawai-Yamada // Methods Enzymol. – 2013. – Vol. 527. – P. 239 – 256.

170. Iwamoto, M. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control / Iwamoto M., Higo H., Higo K. // Plant Science. 2000. – V. 151. – P. 39 – 46.

171. Jimenez – Del– Rio, M. The Bad, the Good, and the Ugly about Oxidative Stress./ Jimenez – Del– Rio M // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – DOI: 10.1155/2012/163913.

172. K El–DougDoug, N. Physiological and molecular defense level in potato cultivars against potato virus x // Annals of Agricultural Science, Moshtohor. – 2020. – Vol. 58. – no. 4. – P. 1079 – 1088.

173. Kaeppler S. M., Kaeppler H. F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants //Plant gene silencing. – 2000. – P. 59 – 68.

174. Kaeppler S.M. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants / S.M. Kaeppler, H.F. Kaeppler, Y. Rhee // *Plant Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 43. – P.179 – 188.
175. Kanematsu, S. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn – superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail / S. Kanematsu, K. Asada // *Plant and Cell physiology*. – 1990. – Vol. 31, no.1. – P. 99 – 112.
176. Kaur, G. Comparison of catalase activity in different organs of the potato (*Solanum tuberosum L.*) cultivars grown under field condition and purification by three–phase partitioning / G. Kaur, S. Sharma, N. Das // *Acta Physiol Plant*. 2020. – Vol. 42. – no. 10. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11738-019-3002-y> (дата обращения: 16.05.2021).
177. Kavitha, R. Regulation of defense–related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato / Kavitha, R. Umesha, S. // *Phytoparasitica*. 2008. Vol. – 36. – P.144 – 159.
178. Khalafalla, M. M. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum l.*) Cultivar almera / M. M. Khalafalla, K. G. A. Elaleem, R. S. Modawi // *Journal of Phytology*. – 2010. – Vol. 1.2, no. 5. – P. 40 – 46.
179. Khalafalla, M. M. Callus formation and organogenesis of potato (*Solanum tuberosum L.*) Cultivar almera / M. M. Khalafalla, K. G. A. Elaleem, R. S. Modawi // *Journal of Phytology*. – 2010. – Vol. 1. 2, no. 5. – P. 40 – 46.
180. Khalid F. Aftab. Effect of exogenous application of 24–epibrassinolide on growth, protein contents, and antioxidant enzyme activities of in vitro – grown *Solanum tuberosum L.* under salt stress / Khalid F. Aftab. // *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2016. – Vol. 52, no. 1. – P. 81 – 91.
181. Khan, A. U. Reactive oxygen species as cellular messengers / A. U. Khan, T. Wilson // *Chemistry & biology*. – 1995. – Vol. 2, no. 7. – P. 437 – 445.
182. Khan, M. I. R. Ethylene reverses photosynthetic inhibition by nickel and zinc in mustard through changes in PS II activity, photosynthetic nitrogen use

efficiency, and antioxidant metabolism / M. I. R. Khan, N. A. Khan // *Protoplasma*. – 2014. – Vol. 251, no. 5. – P. 1007 – 1019.

183. Khan, M. I. R. Modulation and significance of nitrogen and sulfur metabolism in cadmium challenged plants / M. I. R. Khan [et al.] // *Plant growth regulation*. – 2016. – Vol. 78, no. 1. – P. 1–11.

184. Khan, M. I. R. Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat / M. I. R. Khan [et al.] // *Journal of plant physiology*. – 2015. – Vol. 173. – P. 9 – 18.

185. Kim, K. Y. A novel oxidative stress – inducible peroxidase promoter from sweetpotato: molecular cloning and characterization in transgenic tobacco plants and cultured cells / K. Y. Kim [et al.] // *Plant molecular biology*. – 2003. – Vol. 51, no. 6. – P. 831 – 838.

186. Kim, M. D. Enhanced tolerance to methyl viologen induced oxidative stress and high temperature in transgenic potato plants overexpressing the CuZn – SOD, APX and NDPK2 genes / M. D. Kim [et al.] // *Physiologia plantarum*. – 2010. – Vol. 140, no. 2. – P. 153 – 162.

187. Kim, Y. H. Differential expression of 10 sweet potato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation / Y. H. Kim, S. Lim, S. H. Han [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 45, no. 12. – P. 908 –914.

188. Kim, Y. H. Expression of both CuZn SOD and APX in chloroplasts enhances tolerance to sulfur dioxide in transgenic sweet potato plants / Y. H. Kim [et al.] // *Comptes rendus biologiques*. – 2015. – Vol. 338, no. 5. – P. 307 – 313.

189. Kogovsek, P. Aggressive and mild Potato virus Y isolates trigger different specific responses in susceptible potato plants. / Kogovsek P, Pompe-Novak M, Baebler S, Rotter A, Gow L, Gruden K, Foster G.D, Boonham N, Ravnikar M // *Plant Pathol*. – 2010. – Vol.59. – P. 1121 – 1132.

190. Kogovsek, P. Distribution of Potato virus Y in potato plant organs, tissues, and cells / Kogovsek P Kladnik A, Mlakar J, Tusek Z nidaric M,

Dermastia M, Ravnikar M, Pompe–Novak M // *Phytopathology* – 2011 – Vol.101 – P. 1292 – 1300.

191. Kogovsek, P. Physiology of the potato–Potato virus S interaction / Kogovsek P., Ravnikar M. // *Progress in botany*. 2013. – Vol. 34. – P. 101– 133.

192. Kogovsek, P. Single–step RT real–time PCR for sensitive detection and discrimination of Potato virus Y isolates / Kogovsek P, Gow L, Pompe–Novak M, Gruden K, Foster GD, Boonham N, Ravnikar M // *J Virol Methods* . – 2008. – V.149. – P.1 – 11.

193. Kreuze J. F. *Viral Diseases in Potato* / J. F. Kreuze [et al.] // *The Potato Crop*. – Springer, Cham, 2020. – P. 389 – 430.

194. Krishnamurthy, P. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) / P. Krishnamurthy, K. Ranathunge, R. Franke [et al.] // *Planta*. – 2009. – Vol. 230, no. 1. – P. 119 – 134.

195. Kukreja, S. Plant water status, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging enzymes, ethylene evolution and membrane integrity of *Cicer arietinum* roots as affected by salinity / S. Kukreja [et al.] // *Biologia Plantarum*. – 2005. – Vol. 49, no. 2. – P. 305 – 308

196. Kutlu, I. Changes in peroxidase isoenzyme and protein patterns in oat cultivars under cold stress / I. Kutlu [et al.] // *Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi*. – 2016. – Vol. 30, Special Issue. – P.4 – 10.

197. Kutlu, I. Changes in Peroxidase Isoenzyme and Protein Patterns in Oat Cultivars under Cold Stress / I. Kutlu, E. Turhan // 27th International scientific–expert congress of agriculture and food industry : conf., september 2016 with 76/. – URL: [https://www.researchgate.net/publication/316514739\\_Changes\\_in\\_Peroxidase\\_Isoenzyme\\_and\\_Protein\\_Patterns\\_in\\_Oat\\_Cultivars\\_under\\_Cold\\_Stress](https://www.researchgate.net/publication/316514739_Changes_in_Peroxidase_Isoenzyme_and_Protein_Patterns_in_Oat_Cultivars_under_Cold_Stress) (дата обращения: 10.10.2022).

198. Kuzaniak, E. Fungal pathogen–induced changes in the antioxidant systems of leaf peroxisomes from infected tomato plants / E. Kuzaniak, M. Sklodowska // *Planta*. – 2005. – Vol. 222, no. 1. – P. 192 – 200.

199. Kuzniak, E. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves / E. Kuzniak, M. Sklodowska // *J. Exp. Bot.* – 2004. – Vol. 55. – P. 605 – 612
200. Kuzniak, E. The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves / E. Kuzniak, M. Sklodowska // *J. Exp. Bot.* – 2004. – Vol. 55. – P. 605 – 612.
201. Kwon, S. Y. Enhanced tolerance of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen mediated oxidative stress / S. Y. Kwon, Y. J. Joeng, H. S. Lee [et al.] // *Plant Cell Environ.* – 2002. – Vol. 25. – P. 873 – 882.
202. Kwon, S. Y. Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress / S. Y. Kwon [et al.] // *Plant, Cell & Environment.* – 2012. – Vol. 25, no. 7. – P. 873 – 882.
203. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680 – 685.
204. Lambert, S. J. Strain characterization of Potato virus S isolates from Tasmania, Australia / S. J. Lambert, J. B. Scott, S. J. Pethybridge, F. S. Hay // *Plant Dis.* – 2012. – Vol. 96. – P. 813 – 819. – URL: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS-07-11-0573> (дата обращения: 10.04.2021).
205. Lehtonen, M. T. Quickly released peroxidase of moss in defense against fungal invaders / M. T. Lehtonen [et al.] // *New phytologist.* – 2009. – Vol. 183, no. 2. – P. 432 – 443.
206. Li, G. The relationship between active oxygen metabolism and resistance to late blight in potato / Li, G., Zhang, X. & Zhang, S // *Potato Res.* 2018. – Vol. 61. – P. 365–373. – URL: <https://doi.org/10.1007/s11540-018-9391-2> (дата обращения: 16.07.2021).
207. Lowry, O. H. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. // *J. Biol Chem.* – 1951. – V. 193. – P.265 – 275.

208. Lu, P. Differential responses of the activities of antioxidant enzymes to thermal stresses between two invasive eupatorium species in China / P. Lu, W–G. Sang, K–P Ma // J. Integr. Plant Biol. – 2008. – Vol. 50. – P. 393 – 401.
209. Margaritopoulos, J. T. Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialization / J. T. Margaritopoulos, C. Tsourapas, M. Tzortzi [et al.] // Ecol. Ento – mol. – 2005. – Vol. 30. – P. 406 –418.
210. Mathé, C. Evolution and expression of class III peroxidases / C. Mathé [et al.] // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2010. – Vol. 500, no. 1. – P. 58 – 65.
211. McCord, J. M. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) / J. M. McCord, I. Fridovich // Journal of Biological chemistry. – 1969. – Vol. 244, no. 22. – P. 6049–6055.
212. McCord, J. M. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase / J. M. McCord, I. Fridovich // Journal of Biological Chemistry. – 1968. – Vol. 243, no. 21. – P. 5753 – 5760.
213. Meller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Meller // Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
214. Meloni, D. A. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress / D. A. Meloni [et al.] // Environmental and Experimental Botany. – 2003. – Vol. 49, no. 1. – P. 69 – 76.
215. Mhamdi, A. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress–mimic models / A. Mhamdi [et al.] // Journal of Experimental Botany. – 2010. – Vol. 61, no. 15. – P. 4197 – 4220.
216. Milanovic, J. Effects of potato spindle tuber viroid infection on phytohormone and antioxidant responses in symptomless *Solanum Laxum* plants / Milanovic J., Oklestkova, J., Novák, O. et al // J Plant Growth Regul . 2019. – Vol.

38. – P.325–332. – URL: <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9842-7> (дата обращения: 16.07.2021)

217. Milavec M. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by Potato virus YNTN / Milavec M, Gruden K, Ravnikar M, Kovač // *Plant Pathology*. – 2008. – 57. – P 861 – 869.

218. Milavec, M. Peroxidases in the early responses of different potato cultivars to infection by Potato virus Y<sup>NTN</sup> / M. Milavec // *Plant Pathology*. – 2008. – V. 57. – №. 5. – P. 861 – 869.

219. Miller, G. A. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses / G. A. Miller [et al.] // *Plant, cell & environment*. – 2010. – Vol. 33, no. 4. – P. 453–467.

220. Miller, G. A. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses / G. A. Miller // *Plant, cell & environment*. – 2010. – Vol. 33, no. 4. – P. 453 – 467.

221. Mini- PROTEAN Tetra Cell BioRad. Instruction manual. – URL: [www.bio-rad.com/pdf/Isr/literature](http://www.bio-rad.com/pdf/Isr/literature) (дата обращения: 21.03.2021).

222. Minibayeva, F. Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species / F. Minibayeva, O. Kolesnikov, A. Chasov [et al.] // *Plant, Cell Environ*. – 2009. – Vol. 32. – P. 497 –508.

223. Minibayeva, F. Roles of apoplastic peroxidases in plant response to wounding / F. Minibayeva, R. P. Beckett, I. Kranner // *Phytochemistry*. – 2015. – Vol. 112. – P. 122 – 129.

224. Mishra, S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings / S. Mishra, A. B. Jha, R. S. Dubey // *Protoplasma*. – 2011. – Vol. 248, no. 3. – P. 565 – 577.

225. Mittler, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance / R. Mittler // *Trends in Plant Science*. – 2002. – Vol. 7 (9). – P. 405–410

226. Mittler, R. ROS signaling: the new wave? / R. Mittler [et al.] // Trends in plant science. – 2011. – Vol. 16, no. 6. – P. 300–309.
227. Moschou, P. Plant polyamine catabolism: the state of the art / P. Moschou, K. Paschalidis, K. Roubelakis–Angelakis // Plant Signal. Behav. – 2008. – Vol. 12. – P. 1061 – 1066.
228. Mlay, J. A. Pathways of oxidative damage / J. A. Mlay // Annu. Rev. Microbiol. – 2003. – Vol. 57. – P. 395 – 418.
229. Muhammad, A. F. Acquiring control: The evolution of ROS–Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses / A. F. Muhammad, K. N. Adnan, A. S. Javaid [et al.]. – DOI: 10.1016/j.plaphy.2019.04.039 // Plant Physiology and Biochemistry. – 2019. – Vol. 141. – P. 353 – 369.
230. Mullineaux, P. M. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress–responsive gene expression / P. M. Mullineaux, T. Rausch // Photosynthesis research. – 2005. – Vol. 86, no. 3. – P. 459 – 474.
231. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.
232. Murgan, O. K. Response of the antioxidant system of two varieties of potatoes to salt stress / O. K. Murgan [et al.] // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. – 2019. – Vol. 24. – 98 pp.
233. Nakabayashi, R. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by over accumulation of antioxidant flavonoids / R. Nakabayashi, K. Yonekura– Sakakibara, K. Urano K. [et al.] // The Plant Journal. – 2014. – Vol. 77. – P. 367–379.
234. Naraikina, N.V. Changes in the activity of superoxide dismutase isoforms in the course of low–temperature adaptation in potato plants of wild type and transformed with  $\Delta 12$ –acyl–lipid desaturase gene / Naraikina, N.V.,

Sinkevich, M.S., Demin, I.N. // Russ J Plant Physiol . 2014. – Vol. 61. – P. 332 – 338.

235. Navari – Izzo, F. Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper / F. Navari – Izzo, M. F. Quartacci, C. Pinzino [et al.] // Physiol. Plant. – 1998. – Vol. 104. – P. 630 – 638.

236. Nie, Q. Isolation and characterization of a catalase gene HuCAT3 from pitaya (*Hylocereus undatus*) and its expression under abiotic stress / Q. Nie, G. L. Gao, Q. J. Fan [et al.]. – DOI: 10.1016/j.genye.2015.03.007 // Gene. – 2015. – Vol. 563. – P. 63 – 71.

237. Nishiguchi, M. Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism / M. Nishiguchi, K. Kobayashi // Journal of general plant pathology. – 2011. – Vol. 77 (4). – P. 221 – 229.

238. Novo, E. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis / E. Novo, M. Parola // Fibrogenesis & tissue repair. – 2008. – Vol.1, no. 1. – 5 pp.

239. O'Brien, J. A. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism / J. A. O'Brien [et al.] // Planta. – 2012. – Vol. 236, no. 3. – P. 765 – 779.

240. Ogawa, K. Intra and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn – superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls / K. Ogawa, S. Kanematsu, K. Asada // Plant Cell Physiol. – 1996. – Vol. 37. – P. 790 – 799.

241. Ogawa, K. Intra and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn – superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyls / K. Ogawa, S. Kanematsu, K. Asada // Plant Cell Physiol. – 1996. – Vol. 37. – P. 790 – 799.

242. Palatnik, J. F. The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase / J. F. Palatnik, N. Carrillo, E. M. Valle // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 121. – P. 471–478.

243. Passardi, F. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants / F. Passardi, D. Longet, C. Penel, C. Dunand // Phytochemistry. – 2004. – Vol. 65. – P. 1879 – 1893.

244. Penel, C. Signaling via plant peroxidases / C. Penel, C. Dun // Signaling in Plants. – Springer Berlin Heidelberg, 2009. – P. 155 – 171.
245. Pogany, M. Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants / Pogany M. // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. – 2006. – Vol. 41. – no.1. – P. 23– 35
246. Polesskaya, O. G. Changes in the activity of antioxidant enzymes in wheat leaves and roots as a function of nitrogen source and supply / O. G. Polesskaya, E. I. Kashirina, N. D. Alekhina // Russian Journal of Plant Physiology. – 2004. – Vol. 51, no. 5. – P. 615–620.
247. Pompe–Novak, M. Potato virus Y induced changes in the gene expression of potato (*Solanum tuberosum L.*) / Pompe–Novak M, Gruden K, Baebler S, Krecic–Stres H, Kovac M, Jongsma M, Ravnikar M // Physiol Mol Plant Pathol. – 2006. – V.67. – P. 237 – 247.
248. Rahnama, H. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings / H. Rahnama, H. Ebrahimzadeh // Biologia plantarum. – 2009. – Vol. 49, no. 1. – P. 93–97.
249. Rahnama, H. Antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum L.*) under salt stress / H. Rahnama, H. Ebrahimzadeh // Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. – 2006. – Vol. 17, no. 3. – P. 225 – 230.
250. Rahnama, H. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings / Rahnama H., Ebrahimzadeh H. // Biologia plantarum. – 2005. – Vol.. 49, no. 1. – P. 93–97.
251. Roach, T. A proposed interplay between peroxidase, amine oxidase and lipoxygenase in the wounding–induced oxidative burst in *Pisum sativum* seedlings / T. Roach [et al.] // Phytochemistry. – 2015. – Vol. 112. – P. 130 – 138.
252. Ruiz–Sáenz, D. R. Salicylic acid–cryotherapy treatment for elimination of potato Virus S from *Solanum Tuberosum L* / D. R. Ruiz–Sáenz, D. D. Ayala–Hernández, T. Niino [et al] // Am. J. Potato Res. – 2019. – Vol. 96. –

P.225–234. – URL: <https://doi.org/10.1007/s12230-018-09694-4> (дата обращения: 12.12.2020).

253. Sahin, A. Breeding drought resistance cotton cultivars / A. Sahin, I. Eksi, M. N. Kivilcim, N. Ozbek // National AGRIS Center. – 2010. Vol. 2005. – 113 p.

254. Sairam, R. K. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration / R. K Sairam, K. V. Rao, G. C. Srivastava // Plant Science. – 2002. – Vol. 163, no. 5. – P. 1037–1046.

255. Saqib, A. N. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di- saccharide sugars / A. N. Saqib, P. J. Whitney // Biomass and bioenergy. – 2011. – Т. 35. – №. 11. – P. 4748 – 4750.

256. Scandalios, J.G. Catalases in Plant: Gene Structure, Properties, Regulation and Expression / Scandalios J.G., Guan L., Polidoros A.N. // Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. 1997. – P. 343 – 406.

257. Shafi, A. Transgenic potato plants overexpressing sod and apx exhibit enhanced lignification and starch biosynthesis with improved salt stress tolerance / Shafi A. [et al.] // Plant Molecular Biology Reporter. – 2017. – Vol. 35, no. 5. – P. 504 – 518.

258. Shafi, A. Simultaneous over-expression of PaSOD and RaAPX in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers cold stress tolerance through increase in vascular lignifications / Shafi A, Amrina B. et al. // PloS. –2014. – Vol. 9. – P. – 1–24. – doi:10.1371/journal.pone.0110302

259. Shah, J. Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance / J. Shah, J. Zeier // Frontiers in Plant Science. – 2013. – Vol. 4. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579191/> (дата обращения: 14.01.2021)

260. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions / P. Sharma

[et al.] // Journal of botany. – 2012. – Vol. 2012. – P.1 – 27. DOI: /10.1155/2012/217037

261. Sharma, P. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant / P. Sharma, R. S. Dubey // Journal of plant physiology. – 2005. – Vol. 162, no. 8. – P. 854 – 864.

262. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions / P. Sharma [et al.] // Journal of botany. – 2012. – Vol. 2012. – URL: [www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/abs/](http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/abs/) (дата обращения: 10.05.2021).

263. Sharma, P. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions / P. Sharma [et al.] // Journal of botany. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1 – 26.

264. Shigeoka, S. Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants / S. Shigeoka, T. Maruta // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2014. – Vol. 78, no. 9. – P. 1457 – 1470.

265. Shugaev A. G. Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and dormant sugar beet roots / A. G. Shugaev, D. A. Lashtabega, N. A. Shugaeva, E. I. Vyskrebentseva // Russ J. Plant Physiol. – 2011. – Vol. 58. – P. 387 – 393.

266. Smirnoff, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule / N. Smirnoff // Current Opinion in Plant Biology. – 2000. – Vol. 3. – P. 229 – 235.

267. Sousa, G. D. P. Complete genome sequence of the first Andean strain of potato virus S from Brazil and evidence of recombination between PVS strains / G. D. P. Sousa, S. B. Galvino–Costa, S. R. de Paula Ribeiro, R. Figueira Ados // Arch. Virol. – 2012. – Vol. 157, no.7. – P. 1357 – 1364.

268. Su, Y. [Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses / Y. Su [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, no. 1. – P. e84426.

269. Sukweenadhi, J. Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase from *Panax ginseng* enhanced salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* / J. Sukweenadhi [et al.] // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. – 2017. – Vol. 129, no. 2. – P. 337 – 350.
270. Suzuki, N. ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress / N. Suzuki [et al.] // *Plant, Cell & Environment*. – 2012. – Vol. 35, no. 2. – P. 259 – 270.
271. Tang, L. Enhanced tolerance of transgenic potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature / L. Tang, S. Y. Kwon, S. H. Kim [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2006. – Vol. 25. – P. 1380 – 1386.
272. (Kwon.
273. Tang, L. Selection of transgenic potato plants expressing both CuZn – SOD and APX in chloroplasts with enhanced tolerance to oxidative stress / L. Tang [et al.] // *Journal of Plant Biotechnology*. – 2004. – Vol. 31, no. 2. – P. 109 – 113.
274. Tanou, G. Hydrogen peroxide–and nitric oxide–induced systemic antioxidant prime–like activity under NaCl–stress and stress–free conditions in citrus plants / G. Tanou, A. Molassiotis, G. Diamantidis // *Journal of plant physiology*. – 2009. – Vol. 166, no. 17. – P. 1904 – 1913.
275. Tao, D. L. Active oxygen scavengers during cold acclimation of scots pine seedlings in relation to freezing tolerance / D. L. Tao, G. Oquist, G. Wingsle // *Cryobiology*. – 1998. – Vol. 37, no. 1. – P. 38 – 45.
276. Thresh, J.M. The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean regions of South America / J.M. Thresh // *Pests, pathogens and vegetation*. – London, 1981. – P. 89 – 107.
277. Tognolli, M. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* / M. Tognolli [et al.] // *Gene*. – 2002. – Vol. 288, no. 1. – P. 129 – 138.

278. Tseng, M. J. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts / M. J. Tseng, C. W. Liu, J. C. Yiu // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2013. – Vol. 45, no. 10. – P. 822–833.

279. Tseng, M. J. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts / M. J. Tseng, C. W. Liu, J. C. Yiu // *Plant Physiology and Biochemistry*. – 2007. – Vol. 45. – no. 10–11. – P. 822 – 833.

280. Visser, J. C. The Recent Recombinant Evolution of a Major Crop Pathogen, Potato virus Y / J. C. Visser, D. U. Bellstedt, M. D. Pirie. – DOI: 10.1371/journal.pone.0050631 // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol.7, no. 11. – P.e50631.

281. Vysniauskiene, R. The UV–B impact upon the enzyme of antioxidant system superoxide dismutase (SOD) of potato somatic hybrids / Vysniauskiene R., Spalinskas R. T // *Biologija*. 2007. – Vol.2. – P. 67 – 70.

282. Wang, B. Potato viruses in China / B. Wang, Y. Ma, Z. Zang [et al.] // *Crop Protection*. – 2011. – Vol. 30, no.9. – P. 1117 – 1123.

283. Wang, W. Gene expression characteristics and regulation mechanisms of superoxide dismutase and its physiological roles in plants under stress / W. Wang // *Biochemistry (Moscow)*. – 2016. – Vol. 81, no. 5. – P. 465 – 480.

284. Weidemann, H. L. Die Ausbreitung der Kartoffelviren S und M unter feldbedingungen / H. L. Weidemann // *Potato Research*. – 1986. – Vol. 29. – P. 109 – 118.

285. Weydert, C. J. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue / C. J. Weydert, J. J. Cullen // *Nat. Protoc*. – 2011. – Vol. 5, no. 1. – P. 51 – 66.

286. Willekens, H. Molecular identification of catalases from *Nicotiana glumbaginifolia* / Willekens H., Villarroel R., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. // *FEBS Lett*. – 1994. – Vol. 352. – P. 79 – 83.

287. Woodbury, W. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes / W. Woodbury, A. K. Spenser, M. A. Stahmann // *Anal. Biochem.* – 1971. – Vol. 44. – P. 301 – 305.

288. World revised figures show halt in rise in potato production 2020 [Электронный ресурс]: – URL: <https://potatocongress.org/news/world-revised-figures-show-halt-in-rise-in-potato-production/> (дата обращения: 06.02.2022).

289. Xie, X. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant / X. Xie [et al.] // *BioMed research international.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 12–34

290. Xu, J. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots / J. Xu [et al.] // *Plant physiology.* – 2013. – Vol. 161, no. 3. – P. 1517 – 1528.

291. Yamane, Y. Effect of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: Oxygen-evolution activity, fluorescence characteristics and the denaturation process / Y. Yamane, Y. Kashino, H. Koike, K. Satoh // *Photosynthesis Research.* – 1998. – Vol. 57. – P. 51 – 59.

292. Yan, H. Overexpression of CuZn – SOD and APX enhance salt stress tolerance in sweet potato / H. Yan [et al.] // *Plant Physiology and Biochemistry.* – 2016. – Vol. 109. – P. 20 – 27

293. Yildiz-Aktas, L. Droughttolerance in cotton: involvement of non – enzymatic ROS-scavenging compounds / L. Yildiz-Aktas, S. Dagnon, A. Gurel [et al.] // *J. Agron. Crop Sci.* – 2009. – Vol. 195. – P. 247 – 253.

294. Yu, Q. Micronutrient deficiency changes activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in tobacco plants / Q. Yu, L. Osborne, Z. Rengel // *Journal of Plant Nutrition.* – 1998. – Vol. 21, no. 7. – P. 1427 – 1437.

# **ПРИЛОЖЕНИЯ**

# ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Акт внедрения результатов диссертационной работы в  
ФГБОУ ВО «Омский государственный технический университет»

«УТВЕРЖДАЮ»  
проректор по учебной  
работе ФГБОУ ВО ОмГТУ

А.В. Мышлявцев  
2018 г.



## АКТ

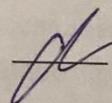
**о внедрении в учебном процессе результатов диссертационной работы  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
Ирины Васильевны Киргизовой**

Результаты диссертационной работы на соискание ученой степени кандидата биологических наук Киргизовой Ирины Васильевны на тему:

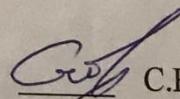
«Функционирование антиоксидантных ферментов у растений картофеля *Solanum tuberosum L.* при кратковременном действии стрессоров»

Внедрены в учебный процесс Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Омского государственного технического университета» при подготовке лекционных и практических занятий для студентов направления подготовки бакалавриата 19.03.01 – «Биотехнология» по дисциплинам «Основы биохимии и молекулярной биологии», «Генетическая инженерия и биобезопасность».

Заведующий кафедрой «Химическая  
технология и биотехнология»  
Омского государственного технического  
университета  
доктор химических наук, профессор

 А.В. Мышлявцев

Доцент кафедры «Химическая технология  
и биотехнология» Омского государственного  
технического университета  
кандидат биологических наук, доцент

 С.Б. Чачина

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Акт внедрения внедрения результатов диссертационной работы  
в ООО «ТПК «Элита-картофель»

### **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «Теплично-парниковый комбинат «Элита-картофель»**

644030, г.Омск  
ул.Д.Бедного, 152  
т. /3812/ 435-818  
факс /3812/ 436-333

ИНН/КПП 5505223431/550501001  
ОГРН 1145543048155  
Р/С 40702810932500000285  
БИК 045004725  
Кор/счет 30101810400000000725  
Филиал ПАО «БАНК УРАЛСИБ»  
г. Новосибирска.

На Ваш № \_\_\_\_\_ от « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 201 \_\_\_\_\_ г.  
№ 07-06/11 от « 15 » 06 2018 г.

### АКТ

внедрения результатов диссертационной работы  
«Функционирование антиоксидантных ферментов у растений картофеля  
*Solanum tuberosum* L. при кратковременном действии стрессоров»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
Киргизовой Ирины Васильевны

Настоящим подтверждаем, что результаты диссертационной работы Киргизовой И.В. по исследованию антиоксидантных ферментов у растений картофеля в ответ на воздействие стрессовых факторов, обладают актуальностью, представляют практический интерес для агропромышленного комплекса г. Омска и Омской области.

Методы определения антиоксидантных ферментов у растений картофеля в культуре *in vitro* были внедрены в лаборатории «Микроклонального размножения» ООО ТПК «Элита-картофель» и использовались при определении активности ферментов действия стрессовых факторов у разных генотипов картофеля.

Внедрение результатов диссертационного исследования Киргизовой И.В. будут способствовать более детальному пониманию естественных защитных механизмов растений картофеля, а так же возможности разработки методик повышения устойчивости растений картофеля к стрессовым факторам окружающей среды.

Директор ООО ТПК «Элита-картофель»

Заведующая лабораторией  
Микроклонального размножения»  
ООО ТПК «Элита-картофель»



А.В. Гладких

Т.М. Пяткова

## ПРИЛОЖЕНИЕ 3

### Акт внедрения результатов диссертационной работы в ООО «Элита»

Российская Федерация  
Общество с ограниченной ответственностью  
«Элита»

Адрес: 644065, г.Омск, ул. Нефтезаводская д.38Е, пом.50  
E-mail: ooo.elita.omsk@gmail.com



#### АКТ

об использовании результатов диссертационной работы И.В. Киргизовой  
**«ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ  
ФЕРМЕНТОВ У РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В УСЛОВИЯХ  
БИОТИЧЕСКОГО И АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССОВ»**

Настоящим подтверждаем, что результаты диссертационного исследования Киргизовой И.В. на тему: «Особенности накопления антиоксидантных ферментов у растений картофеля в условиях биотического и абиотического стрессов» обладают актуальностью, представляют практический интерес.

Результаты работы по получению безвирусных растений-регенерантов картофеля сортов «Алена», «Ермак», «Хозяюшка» были внедрены на базе лаборатории «Аэропоника» и использованы в процессе запуска промышленной аэропонной установки для получения свободных от вирусных инфекций мини клубней отечественных сортов картофеля (г. Омск, Россия).

Результаты работы включены в патент на Изобретение Российской Федерации «Установка для аэропонного выращивания растений in vitro» (№ 2752427).

## ПРИЛОЖЕНИЕ 5



## ПРИЛОЖЕНИЕ 6



## ПРИЛОЖЕНИЕ 7

Акт о результатах проверки микрорастений методом ИФА испытательной лаборатории «Отдела биотехнологии и иммунодиагностики» ФГБНУ ВНИИКХ

### СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ «РОССЕЛЬХОЗЦЕНТР»

Испытательная лаборатория *Отдел биотехнологии и иммунодиагностики*  
**ФГБНУ ВНИИКХ**  
№ в Госреестре РОСС RU ДС 1.6.1.105

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*по результатам лабораторного тестирования материала*

**АКТ № 0626**

п.Коренево

"27" ноября 2018 г.

*Заявитель:* ФГБОУ ВО ОмГТУ, Омск-50, проспект Мира, 11, А.В.Косых  
*Материал:* растения *in vitro*: Алена, Лазарь, Хозяюшка по 2 шт., всего 6 проб  
тестировали на присутствие патогенов: PVX, PVS, PVM, PVY, PLRV.

№пп	Сорт	Кол-во, шт.	Наличие патогенов				
			PVX	PVS	PVM	PVY	PLRV
1.	Алена	2	0	0	0	0	0
2.	Ермак	2	0	0	0	0	0
3.	Хозяюшка	2	0	0	0	0	0



Руководитель Испытательной лаборатории:  
Зав.отделом биотехнологии  
и иммунодиагностики ВНИИКХ

А.И.Усков

## ПРИЛОЖЕНИЕ 8

### Акт о результатах проверки микрорастений методом ИФА испытательной лаборатории «Отдела биотехнологии и иммунодиагностики» ФГБНУ ВНИИКХ

#### СИСТЕМА ДОБРОВОЛЬНОЙ СЕРТИФИКАЦИИ «РОССЕЛЬХОЗЦЕНТР»

Испытательная лаборатория *Отдел биотехнологии и иммунодиагностики*  
ФГБНУ ВНИИКХ  
№ в Госреестре РОСС RU ДС 1.6.1.105

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*по результатам проверки тестируемого материала методом ИФА*

**АКТ № 0692**

п.Коренево

"25" декабря 2019 г.

*Заявитель:* ФГБОУ ВО Омский ГТУ, г.Омск, И.Киргизова

*Материал:* микрорастения – 14 образцов тестировали на присутствие патогенов: PVX, PVS, PVM, PVY, PLRV.

№ пп.	Сорт	Положительные реакции на патогены				
		PVX	PVM	PVS	PVY	PLRV
1.	Хозяюшка	0	0	0	0	0
2.	Алена	0	0	0	0	0
3.	Алена	0	0	0	0	0
4.	Ермак	0	0	0	0	0
5.	Ермак	0	0	0	0	0
6.	Хозяюшка	0	0	+	0	0
7.	Ермак	0	0	+	0	0
8.	б/н	0	+	+	0	0
9.	Алена	0	0	+	0	0
10.	б/н	0	0	0	0	0
11.	б/н	0	0	0	0	0
12.	б/н	0	+	+	0	0
13.	б/н	0	0	+	0	0
14.	б/н	0	0	0	0	0



Руководитель Испытательной лаборатории:  
Зав.отделом биотехнологии  
и иммунодиагностики ВНИИКХ

А.И.Усков