

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ МИКРОКЛОНОВ КАРТОФЕЛЯ (*S. TUBEROSUM* L.) НА ИНФИЦИРОВАНИЕ ВИРУСОМ PVS

И.В. Киргизова^{1,2}, Е.А. Калашникова¹

¹ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева»

²ФГАОУ ВО «Омский государственный технический университет»

Поступила в редакцию 05.09.2022 г.

Аннотация. В данной статье представлены результаты по исследованию активности антиоксидантной системы картофеля в ответ на инфицирование PVS вирусом. Вирус картофеля PVS является основным наиболее распространенным и вредоносным вирусом на территории Омской области, который поражает картофель. Поэтому необходимо было провести исследования активности антиоксидантных ферментов у отечественных сортов картофеля в ответ на инфицирование вирусом PVS и общее содержание белка и крахмала для проведения дальнейших селекционных работ по созданию сортов, обладающих устойчивостью к вирусам картофеля, с более длительным периодом хранения клубней и повышением их питательной ценности. Целью исследования являлось изучение ответной реакции микроклонов *S. tuberosum* L. на инфицирование мозаичным вирусом PVS. Объектами исследования были сорта картофеля Ермак, Алена и Хозяюшка селекции ФГБНУ «Омский аграрный научный центр». Установлено, что способность к образованию каллусов зависела от типа первичного эксплантата. Культивирование листовых эксплантов на питательной среде с содержанием 2,4-Д и кинетина приводило к образованию каллусной ткани в 98-100% случаев, а при использовании стеблевых эксплантов в – 60% в условиях темноты, не зависимо от ориентировки на питательной среде. Из каллусной ткани получены растения-регенранты. Установлено, что у микроклонов картофеля активность пероксидазы (РОХ), каталазы (САТ), супероксиддисмутазы (SOD) при инфицировании PVS⁰ была значительно выше по сравнению с контрольными растениями. Наибольшие различия физиологического ответа отмечали в активности РОХ у микроклона (ХС–94 – 4.5 мкМ АК/мин·мг белка), снижение активности пероксидазы отмечали у микроклона (ЕС–1–0.75 мкМ АК/мин·мг). Большую активность САТ проявлял микроклон восприимчивого к вирусам сорта Ермак (ЕС–1), по сравнению с другими генотипами. Наибольшая активность SOD была отмечена у микроклонов (ХС–94), и незначительную активность у микроклонов сорта Ермак (ЕС–1). Показаны изменения в спектре антиоксидантных ферментов, который характеризовался появлением дополнительных изоформ у микроклонов, полученных от сортов Хозяюшка и Алена, что свидетельствовало о формировании у этих образцов более устойчивой системы защиты в ответ на вирусную инфекцию. Образование меньшего числа изоформ исследуемых ферментов в ответ на вирусное заражение у микроклонов, полученных от сорта Ермак по сравнению с контрольными растениями подтверждало его восприимчивость к заражению вирусом PVS⁰.

Полученные результаты свидетельствуют о различной активности системы антиоксидантной защиты у восприимчивых и устойчивых сортов картофеля, а активность антиоксидантных ферментов может служить маркерным признаком при ранжировании образцов картофеля при проведении селекционных работ.

Ключевые слова: картофель, вирус картофеля PVS, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, микроклоны.

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одним из важнейших продовольственных продуктов в мировом сельском хозяйстве, являющийся круглогодичным источником витаминов и минеральных веществ [1]. Согласно статистическим исследованиям автономной организации World Potato

Congress за 2020–2021гг. Российская Федерация входит в список 25–ти основных мировых лидеров по объемам производства картофеля [2]. Несмотря на большой объем производства картофеля, в промышленных масштабах широко используются сорта зарубежной селекции и некоторые отечественные сорта картофеля [3]. В настоящее время в связи со сложившейся обстановкой на мировой

арене, вызванной введением санкций и сокращением импорта семенного картофеля, использование сортов зарубежной селекции предопределило зависимость картофелеводческих предприятий от импорта исходного генетического материала. Причем, вследствие недостаточного контроля скрытой вирусной инфекции у импортируемого картофеля, наблюдается снижение качественных показателей в процессе выращивания, что приводит к большим экономическим потерям [4].

На территории Западно-Сибирского региона выращивают сорта картофеля зарубежной селекции, на долю которых приходится до 75% в общем объеме посадочного материала [5]. Одним из наиболее широко распространенных ограничивающих факторов использования отечественного посадочного материала на территории региона, снижающих продуктивность и качество картофеля, являются вирусы. Вследствие отсутствия обновления семенного материала, на грани вырождения находятся известные сибирские сорта, такие как Ермак, Седов и др [6]. Сорта отечественной селекции составляют около 5% в ЛПХ, а в целом по Омской области не более 10–15% [7].

Одним из широко распространенных на территории г. Омска и Омской области фитопатогенов, поражающих культуру картофеля, является PVS вирус. Распространение вирусных частиц в основном осуществляется посредством контакта между здоровыми и пораженными растениями, стеблевыми или клубневыми прививками, а также насекомыми-переносчиками. В настоящее время, считаются, что признанными являются два штамма вируса PVS: обычный (PVS⁰) и штамм Andean (PVS^A) [8]. На территории Омской области был обнаружен штамм PVS⁰ у семенного картофеля. Штамм Andean (PVS^A), в отличие от более широко распространенного штамма PVS⁰, вызывает более серьезное поражение растений картофеля, приводящее к преждевременному отмиранию листьев. Основными признаками инфицирования вирусом являются: углубление жилок, морщинистость, крапчатость, некоторые сорта картофеля реагируют краевым некрозом листьев и жилкованием. Урожай картофеля при поражении вирусом PVS снижается до 20%, а при совместном поражении с другими фитовирусами такими как, PVS + PVM и PVS + PVX урожайность снижается до 50% [9].

Вирус PVS является широко распространенным стрессором на территории региона, поражающим картофель. За счет своего внутриклеточного развития вирус является потенциально опасным,

вследствие малой эффективности применения химических средств защиты при обработке, а также недостаточного контроля скрытой вирусной инфекции и отсутствия обновления отечественного семенного материала. В современных условиях реализации политики импортозамещения актуальными являются исследования по возрождению отечественных и созданию комплексно устойчивых сортов для выращивания в различных климатических и почвенных условиях.

Для агропромышленного комплекса Омской области представляется перспективным вовлечение отечественных сибирских сортов картофеля в селекционный процесс, как высокоурожайных и устойчивых к климатическим особенностям региона. Получение новых сортов картофеля с повышенным содержанием крахмала и обладающих устойчивостью к вирусам картофеля, для выращивания в условиях Западно-Сибирского региона, позволит обеспечить сочетание высокой урожайности этой важной сельскохозяйственной культуры с более длительным периодом хранения клубней и повышением их питательной ценности.

Для повышения эффективности селекционного процесса и выведения новых сортов с комплексом хозяйственно-ценных признаков важно иметь разнообразный исходный генетический материал, а сочетание традиционной селекции и биотехнологии является наиболее эффективным инструментом для решения таких задач. Анализ современных научных источников показал, что наиболее эффективным методом селекции при получении новых линий картофеля может выступать спонтанный мутагенез, который может быть вызван активацией транспозонов, приводящих к изменению экспрессии собственных генов растения и появлением точечных мутаций. Использование таких клеток и тканей в культуре *in vitro* позволяет получать новые линии растений, характеризующихся новыми хозяйственно-ценными признаками, а также может быть использовано для создания комплексно устойчивых растений и значительно сократить сроки селекционного процесса. Кроме того, проведение физиолого-биохимических исследований ответной реакции растений картофеля на инфицирование вирусами, позволит ранжировать образцы по устойчивости при проведении селекционных работ.

Поэтому актуальным является проведение исследования активности антиоксидантных ферментов у сибирских сортов картофеля в ответ на инфицирование вирусом PVS, а также опреде-

ление общего содержания белка и крахмала для проведения дальнейших селекционных работ по созданию новых сортов, обладающих устойчивостью к вирусам, с более длительным периодом хранения клубней и повышением их питательной ценности.

Цель данной работы заключалась в исследовании ответной реакции микроклонов *S. tuberosum* L. на инфицирование мозаичным вирусом PVS.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследований были выбраны сибирские сорта картофеля: Алена, Ермак, Хозяюшка (ФГБНУ «Омский аграрный научный центр») [10].

Получение каллусной культуры, пассирование и индукцию стеблевого органогенеза. Клубни стерилизовали 96% этиловым спиртом в течение 15 сек. с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой. Затем их помещали в термостат ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) для инициации образования побегов. Срок проращивания варьировал в зависимости от сортовых особенностей (30–45 суток) до образования ростков (1–2 см). В качестве эксплантов использовали листья и стебли размером 4–6 мм. Стерилизацию растительного материала проводили в 4% растворе коммерческого препарата «Белизна» (действующее вещество гипохлорит натрия) в течение 10 мин., затем стерилизовали 70% спиртом 1 мин., с последующей промывкой стерильной дистиллированной водой [11]. Каллусную ткань из растительных эксплантов получали на питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасиге–Скуга (МС) с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в концентрации 1–5 мг/л, 6-фурфуриламинопурин (кинетин) 0.05–0.25 мг/л, сахарозы 30000 мг/л и агара 7000 мг/л [12]. Контролем служила питательная среда без гормонов. Экспланты культивировали в чашках Петри, в условиях термостата ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) в полной темноте. Пассирование каллусной ткани проводили каждые 30–35 суток. Растения-регенранты (сомаклоны) получали из каллусной ткани на 1, 7 и 19-ом пассаже, из активно растущего каллуса, идентичного по фенотипическим показателям.

Регенерация растений in vitro и выращивание микроклонов в почвенных условиях. Для регенерации растений из каллусной ткани использовали питательную среду, в состав которой входили следующие компоненты: минеральные соли по прописи МС, зеатин (1.0 мг/л), индоллил-3-уксусная

кислота (ИУК 0.1 мг/л), фолиевая кислота (0.5 мг/л), глюкоза (10000 мг/л), сахароза (30000 мг/л) и агар (7000 мг/л). Культивирование проводили при температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$, освещенности 5000 лк и 16-ти часовом фотопериоде. Растения-регенранты, полученные из каллусной ткани, после 4 месяцев культивирования, для адаптации переносили на 10–15 суток в пластиковые горшочки, содержащие перлитовый песок, затем растения пересаживали в горшочки со смесью торфа и песка в соотношении 3:1, с последующей пересадкой в естественные полевые условия. Почву в теплице обрабатывали 0.1% перманганатом калия и препаратом Фундазол для исключения грибной инфекции. Растения высаживали на расстоянии 15–20 см друг от друга и на 4 сутки выращивания производили полив раствором Кнопа. В качестве маркерных признаков акцентировали внимание на признаки цвета мякоти и окраски кожуры. Клубни первой репродукции тестировали по фенотипическим признакам (цвет мякоти, окраска кожуры), отобранные образцы использовали для получения клубней второй репродукции, которые были использованы для оценки содержания крахмала и общего белка. Содержание крахмала в клубнях картофеля проводили методом кислотного гидролиза [13]. Количество белка определяли по методу Лоури [14].

Моделирование биотического стресса (Вирус PVS⁰, DSMZ PV – 0838). Для заражения отбирали растения в возрасте 4–х недель в строгом соответствии сортовым особенностям по морфологическим признакам (высота растений, развитие листовых пластинок, вегетационная масса). Инокулировали листовые пластинки при микроповреждении карборандумом свежеприготовленной смесью вирусных частиц и фосфатного буфера. Инокуляционная смесь содержала 10 мМ натрий-фосфатный буфер (pH 6.9–7.0 (pH метр, Consort C931, Бельгия) и карборандум (d=0.037мм) в соотношении 1:3 [15]. Растения контрольной группы обрабатывали той же смесью, но с отсутствием вирусных частиц.

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-ELISA). В лунки микротитровального планшета вносили очищенные поликлональные антитела к соответствующему вирусу разведенные в карбонат-

ном буфере (рН 9.6) в соотношении (1:1000мкл) в количестве 200 мкл/лунку и выдерживали при температуре 4°C, 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°C, 24 часа, после чего четырехкратно промывали PBS-Tween, вносили в лунку по 200 мкл конъюгированные вирусспецифические антитела на 3 ч., при температуре 37°C. Далее планшеты инкубировали со свежим субстратным буфером п-нитрофенилфосфата в течение 30 мин. при 25°C, 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.

Определение уровней активности антиоксидантных ферментов. Работу проводили на спектрофотометре (Pharmacia LKB Ultrospec III UV/Vis 9245, США) с использованием кварцевых кювет (10*10*45 (L) мм) по ГОСТ 8.229–81.

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 Anova test) проведен посредством программного обеспечения GraphPad Prism (v.6.01). Данные представлены в относительных единицах.

Определение активности растворимой ПОХ осуществляли колориметрическим методом (590 нм, 120 сек.), который основан на определении скорости реакции окисления бензида до образования синего продукта его окисления при наличии перекиси водорода и пероксидазы [16].

Определение активности САТ проводили спектрофотометрическим методом (240 нм, 120 сек.), который основан на определении скорости разложения перекиси водорода каталазой исследуемого объекта с образованием кислорода и воды. 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.

Определение активности SOD определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (NBT) с некоторыми модификациями [17]. 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. Разделение изоформ ферментов САТ и SOD осуществляли методом нативного ПААГ–электрофореза белков в неденатурирующих условиях, по методу, описанному Kliebenstein, на приборе Bio-Rad («Tetra cell Mini protein 3», Mini-PROTEAN Tetra Cell BioRad, США, 2021) [18]. В состав электродного буфера (рН 8.8) входили 1.8 мМ ЭДТА, 50 мМ Трис–НСl и 300 мМ глицина, в лунки вносили по 50 мкг белка для идентификации SOD, 20 мкг белка для САТ. Нативный форез проводили в 7.5% полиакриламидном геле (4°C, 2мА, 2ч. 20 мин.). В состав элек-

тродного буфера для определения изоформ пероксидазы (рН 8.3) входили 25 мМ Трис–HCl, 192 мМ глицина и 0.1% додецилсульфата натрия.

Определение активности изоферментов CAT in gel. Использовали двухкомпонентный субстрат с некоторыми модификациями метода предложенным J.M. Chandler и J.G. Scandalios [19]. Определение изоферментов каталазы проводили по методу Davis, 1964 в 10% полиакриламидном геле при температуре 4°C, 20 ч, 80В. Проводили окрашивание, основанное на восстановлении гексацианоферрата (III) калия молекулами перекиси водорода до гексацианоферрата (II) калия и последующей реакции гексацианоферрата (II) калия с хлоридом железа (III) с образованием берлинской лазури. Для визуализации изоферментов гель инкубировали в 4 мМ растворе перекиси водорода в буфере Трис–HCl (50 мМ, рН 7.6, 5 мин.), после чего гель промывали в буферном растворе и проводили специфическое окрашивание с 1% гексацианоферратом (III) калия и 1% хлоридом железа (III), Гели инкубировали до появления светлых полос на темно-зеленом фоне, после гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программного обеспечения Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Гель трижды промывали в дистиллированной воде (15 мин.), инкубировали в 100 мл 0.03% перекиси водорода (10 мин.) при постоянном покачивании на шейкере (80 об/мин). Гели окрашивали в смеси первого и второго субстратов до проявления бесцветных полос на окрашенном в темный зеленый или сине-зеленый цвет фоне, после чего гель промывали в дистиллированной воде [20].

Определение активности изоферментов POX in gel. Электрофорез 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 электродный буфер имел тот же состав. Рабочий гель полимеризовали в 0.375 М трис–HCl (рН 8.8), а формирующий гель – 0.0625 М трис–HCl (рН 6.8). После проводили окрашивание Кумасси R-250, гель сканировали и определяли относительные молекулярные массы белков в программе «Sigmagel». Активность фермента проявляли с помощью субстрата, содержащего 50 мл 50 мМ ацетатного буфера (рН 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, после чего гели промывали 10% уксусной кислоты.

Определение активности изоферментов SOD in gel. Определение изоформ проводили согласно протоколу С.Н. Beauchamp и I. Fridovich с небольшими модификациями [21]. Для идентифицирования изоформ фермента гель с исследуемыми образцами после электрофореза инкубации в растворах ингибиторов, 1–3 мМ KCN или 1–5 мМ H₂O₂, за 30 мин до окрашивания. Изоформа Mn-SOD устойчива к обоим ингибиторам, Fe-SOD устойчива к KCN, но чувствительна к H₂O₂, тогда как изоформа Cu/Zn-SOD чувствительна к обоим ингибиторам.

Далее гель промывали трижды в дистиллированной воде (5 мин.), далее гель инкубировали в 0.1% растворе нитросинего тетразолия (NBT, 15 мин.) с внесением 4% этанола при покачивании на шейкере (80 об/мин) в условиях полной темноты. После гель промывали и инкубировали в 50 мМ натрий – фосфатном буфере (рН 7.8) с содержанием 28 мМ рибофлавина, 28 мМ TEMED, 0.25 мМ NBT на шейкере (80 об/мин, 15 мин.) в условиях темноты. Гель с дистиллированной водой иллюминировали в гелъдокументирующей системе (Fusion–FX6–XT–820.WL/M) под УФ – облучением (30–45 мин., t 20–25°C) до появления бесцветных полос SOD на темно-фиолетовом фоне геля. Для определения активности изоформ фермента гели сканировали, инвертировали и анализировали с помощью программного обеспечения Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (табл.1).

Таблица 1

Каллусообразующая способность разных типов эксплантов картофеля на питательной среде ПС–5 (5 мг/л 2,4–Д и 0.25 мг/л кинетина)

Наименование сорта картофеля	Каллусообразующая способность, %	
	Листовые экспланты	Стеблевые экспланты
Ермак	100.0	48.0
Алена	95.0	60.0
Хозяюшка	85.0	61.0

Визуальные наблюдения показали, что начало каллусогенеза на листовых эксплантах отмечено

на 7–9 сутки. Наиболее интенсивный каллусогенез наблюдали на среде, содержащей 5 мг/л 2.4–Д и 0.25 мг/л кинетина, при этом формировалась каллусная ткань средней плотности и светло–желтого цвета с меристематическими участками, из которых в дальнейшем формировались растения. Процесс образования каллуса проходил более активно при культивировании эксплантов в условиях полной темноты. При выращивании каллусной ткани при освещении наблюдали образование белого налета на поверхности и образование мелких глобулярных структур по периферии.

В дальнейшем из морфогенных каллусных культур было получено 150 растений–регенерантов каждого сорта, которые были проанализированы методом ИФА на отсутствие мозаичных вирусов картофеля на базе испытательной лаборатории «Отдела биотехнологии и иммунодиагностики» ФГБНУ ВНИИХХ. Проведенные исследования подтвердили, что все растения безвирусные. Установлено, что 98.7% растений имели нормальную морфологию и высокую жизнеспособность. Для остальных растений (1.3%) отмечено формирование укороченных междоузлий. Дальнейшее культивирование растений в течение 3–4 пассажей приводило к появлению большего количества аномальных растений (формировались укороченные междоузлия и изменялась форма листовых пластинок), которые погибали при пересадке в почвенные условия. В результате культивирования растений–регенерантов были получены клубни первой репродукции.

По результатам морфологического анализа были отобраны образцы, различающиеся по цвету мякоти. Так, например, в контроле цвет мякоти был белый, в то время как в опытных образцах – бледно–желтый и желтый. Наибольший интерес представляли образцы картофеля ЕС–1, ЕС–2, АС–58, АС–72, АС–91, ХС–17, ХС–94, которые отличались от исходных линий по содержанию крахмала (рис.1).

Так, например, образец ЕС–1 превосходил по содержанию крахмала контрольный вариант в 1.6 раза – 15.4% и 9.4% соответственно, а образец ЕС–2 превосходил контроль в 1.4 раза – 13.1%. Необходимо отметить, что образец ЕС–1 характеризовался нетипичным цветом мякоти клубней и имел более темный оттенок. Образцы АС–58 и АС–72 по общему содержанию крахмала не превышали контрольный вариант (сорт Алена), в то время как образец АС–91 отличался повышенным содержанием крахмала (18.6%) и имел нетипич-

ный цвет мякоти клубней светло–фиолетового оттенка, а также более темный цвет кожуры. Содержание крахмала у сорта Хозяюшка составляло 18.4%, а у образцов ХС–17 и ХС–94 составило 10.3% и 25.4% соответственно. Установлено, что наибольшее количество крахмала в клубнях было у среднеспелого сорта Хозяюшка и его соматклонов по сравнению с ранними сортами Алена и Ермак. Наши данные подтверждают результаты С.П. Бурлова, который показал, что максимальное содержание крахмала было у среднеспелых сортов Гранат –17.9%, Криница–19.6% [22].

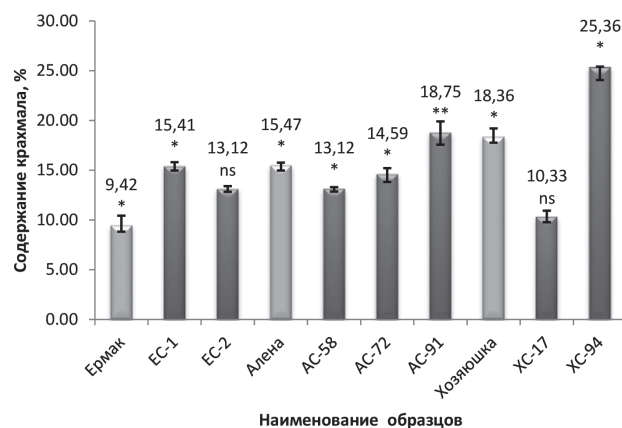


Рис. 1. Общее содержание крахмала в клубнях картофеля соматклонов, полученных на основе сибирских сортов, где столбцы Ермак, Алена, Хозяюшка - контроль для каждого соматклона соответствующего сорта; ЕС-1, ЕС-2, АС-58, АС-72, АС-91, ХС-17, ХС-94 - соматклональные образцы картофеля. Обозначения: * - значительная ($P < 0,05$); ** - очень значительная ($P < 0,0001$) и "ns" - незначительная ($P > 0,05$) разница 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.

По содержанию белка исследуемые образцы картофеля варьировали. Согласно данным рисунка 2, у образцов среднеспелого сорта Хозяюшка и его соматклонов отмечено повышенное содержание белка по сравнению с ранними сортами Ермак и Алена. В образцах ХС–17 и ХС–94 содержание белка было выше контрольного варианта (сорт Хозяюшка) в среднем в 1.3–1.5 раза. Для сортов Ермак и Алена содержание белка в соматклонах было ниже или на уровне контроля. Исключение составил образец АС–72 (сорт Алена), для которого содержание белка было выше контрольного варианта

в 2 раза. На основании проведенных исследований было установлено, что увеличение продолжительности культивирования *in vitro* сопровождалось повышением частоты соматональной изменчивости и увеличением измененных признаков.

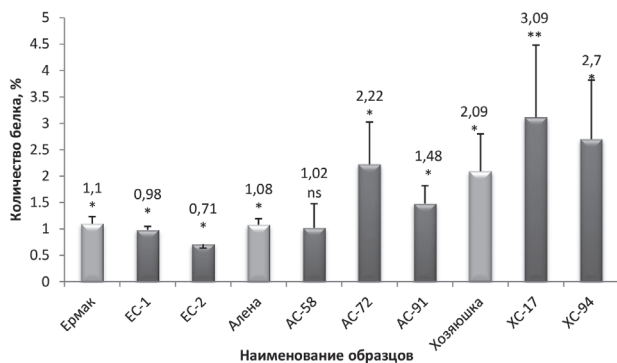


Рис. 2. Общее содержание белка в клубнях картофеля соматоклонов, полученных на основе сибирских сортов, где столбцы Ермак, Алена, Хозяюшка - контроль для каждого соматоклона соответствующего сорта; ЕС-1, ЕС-2, АС-58, АС-72, АС-91, ХС-17, ХС-94 - соматоклональные образцы картофеля. Обозначения: * - значительная ($P < 0,05$); ** - очень значительная ($P < 0,0001$) и "ns" - незначительная ($P > 0,05$) разница в содержании крахмала в клубнях между контрольными сортами и соматоклональными вариантами. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения ($\pm SD$) при помощи графического редактора ImageJ.

После проведения инокуляции растений вирусом PVS⁰ было отмечено, что у растений на 14 сутки незначительно проявлялись внешние признаки развития вирусной инфекции, которые отсутствовали в контроле. Проведена экспресс-диагностика ИХА в результате которой были отобраны инфицированные растения, после чего проведена ИФА диагностика, для подтверждения наличия вируса. Такие растения были использованы в дальнейшей серии экспериментов по определению биохимических показателей.

Первоначально была определена активность антиоксидантных ферментов САТ, РОХ, SOD растений картофеля, отличающихся по устойчивости к вирусам. Сорт Хозяюшка - устойчивый сорт, Алена - умеренно устойчивый сорт, Ермак - чувствительный к вирусной инфекции сорт картофеля. Экспериментально установлено, что активность ферментов была различной среди инфицированных соматоклонов, отобранных на основании большего количества измененных признаков (цвет мякоти,

общее содержание белка и крахмала) и контрольных сортов, инфицированных вирусом. Основные результаты приведены на рисунках 3–5.

При определении активности РОХ у микроклонов картофеля установлено, что активность растворимых ионно- и ковалентно связанных РОХ отличалась у разных по восприимчивости сортов в ответ на инфекцию PVS⁰ (рис.3). Показано, что для образца ХС-94, полученного от сорта Хозяюшка, и образца АС-91, полученного от сорта Алена, учитываемый показатель превосходил контроль в среднем в 2 и 1.8 раза соответственно, в то время как для образца ЕС-1, полученного от сорта Ермак, прослеживалось уменьшение фермента в 2 раза, по сравнению с контролем. Полученные данные согласуются с исследованиям других авторов, в которых показано, что активность растворимых ионно- и ковалентно связанных РОХ отличалась у разных по восприимчивости сортов в ответ на инфекцию PVY [23]. Так, например, в исследованиях Kogovsek P, Pompe-Novak M., отмечается, что у чувствительных сортов Igor и Nadine наблюдаются различия в экспрессии генов, отвечающих за активацию антиоксидантных ферментов после инфицирования вирусом. Кроме того отмечен различный специфический ответ растений на изоляты одного вируса [24]. Наиболее выраженные изменения активности РОХ были обнаружены у устойчивых сортов Pentland Squire и Sante, где активность РОХ была вдвое больше по сравнению с контролем, причем сорт Sante показал повышенную активность всех трех типов пероксидаз в верхних не инокулированных листьях.

При определении активности САТ у микроклонов картофеля была установлена общая закономерность (рис.4): во всех инфицированных образцах наблюдается увеличение активности в среднем в 1.2–1.7 раза. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов [25]. Показано, что большая активность фермента была характерна для восприимчивого и умеренно устойчивого сортов по сравнению с устойчивым сортом. Активность САТ при инфицировании может быть прямо ассоциирована с увеличением аккумуляции перекиси водорода при распространении вирусной инфекции PVS⁰, а активация САТ может быть частью вирусной стратегией для подавления защитных механизмов растений за счет снижения аккумуляции перекиси водорода в пораженных участках. Все это может приводить к снижению окислительного стресса и повышению восприимчивости к инфекции.

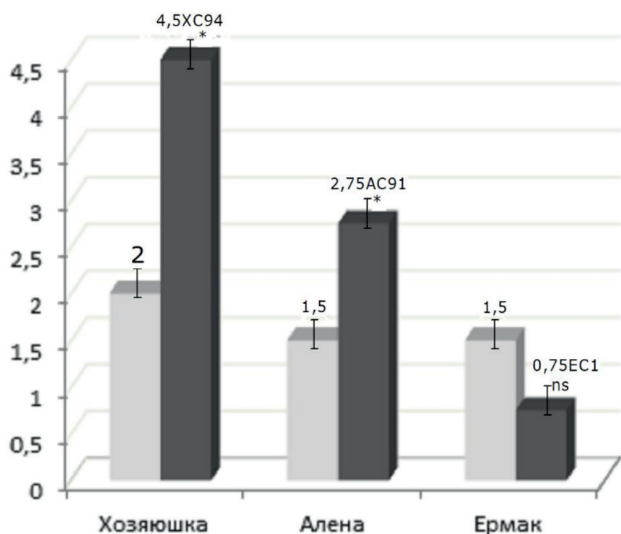


Рис. 3. Определение общей активности РОХ в листьях растений картофеля при инфицировании вирусом картофеля PVS⁰. Слева сорта Хозяюшка, Алена, Ермак - контроль для каждого соматклона соответствующего сорта, справа - соматклональные варианты ЕС-1 полученные от сорта Ермак, АС-91 от сорта Алена и ХС-94 от сорта Хозяюшка. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения (\pm SD) при помощи графического редактора Image J. Обозначения: * - значительная ($P < 0,05$); "ns" - незначительная ($P > 0,05$) разница в активности РОХ при инфицировании вирусом между контрольными сортами и микроклонами.

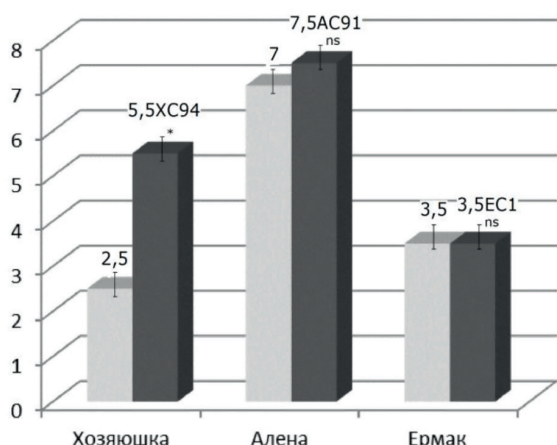


Рис. 4. Определение общей активности САТ в листьях растений картофеля при инфицировании вирусом картофеля PVS⁰. Слева сорта Хозяюшка, Алена, Ермак - контроль для каждого соматклона соответствующего сорта, справа - соматклональные варианты ЕС-1 полученные от сорта Ермак, АС-91 от сорта Алена и ХС-94 от сорта Хозяюшка. Обозначения аналогичны рис 3.

При определении активности SOD у микроклонов картофеля отмечена зависимость этого показателя от сортовых особенностей (рис. 5). Так, для устойчивого сорта в образце ХС-94 было характерно увеличение активности SOD в среднем в 2 раза, в то время как для образцов АС-91 и ЕС-1, полученных из умеренновосприимчивого и восприимчивого сортов данный показатель был на уровне или незначительно превышал контрольный вариант. Наши данные согласуются с результатами исследований других авторов. Например, El. Кому, М.Н., Saleh показали, что у растений картофеля в ответ на биотический стрессор резко повышается уровень активности SOD у устойчивых сортов [26].

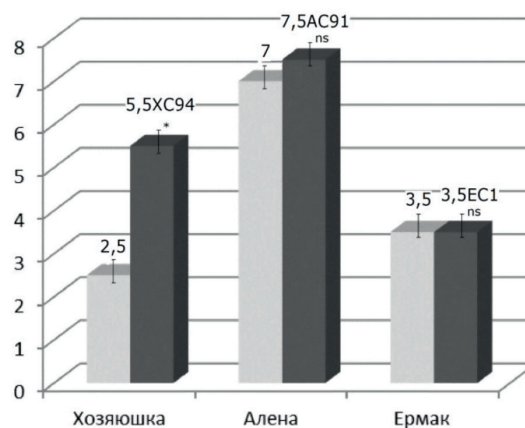


Рис. 5. Определение общей активности SOD в листьях растений картофеля при биотическом стрессоре где, синим цветом на графике обозначены сибирские сорта Хозяюшка, Алена, Ермак - контроль для каждого соматклона соответствующего сорта; красным цветом обозначены соматклональные варианты ЕС-1 полученные от сорта Ермак, АС-91 от сорта Алена и ХС-94 от сорта Хозяюшка. Данные с четырех независимых повторов были преобразованы в числовые значения (\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 при инфицировании вирусом между контрольными сортами и микроклонами.

В следующей серии экспериментов нами была определена активность РОХ *in gel*. При определении изоферментного спектра у контрольной группы растений выявлена активность 4–5 изоформ, в то время как у инфицированных растений 5–6 (рис. 6). У микроклонов, полученных от восприимчивого сорта, инфицированного вирусом,

было обнаружено два дополнительных изоформа по сравнению с контролем. Активность изопероксидаз у соматклона, полученного от восприимчивого к вирусным и бактериальным инфекциям сорта Ермак увеличивалась при заражении мозаичным вирусом картофеля, которая проявлялась в интенсификации окрашивания полос по сравнению с контрольным образцом V3. Для умеренноустойчивого сорта и его соматклонального образца количество изоформ не изменялось. Следует отметить, что у устойчивого сорта и полученного соматклонального образца X-91 количество изопероксидаз не увеличивалось, но отмечалась более интенсивная окраска полос у инфицированного образца по сравнению с контролем, что свидетельствовало об увеличении активности изопероксидаз.

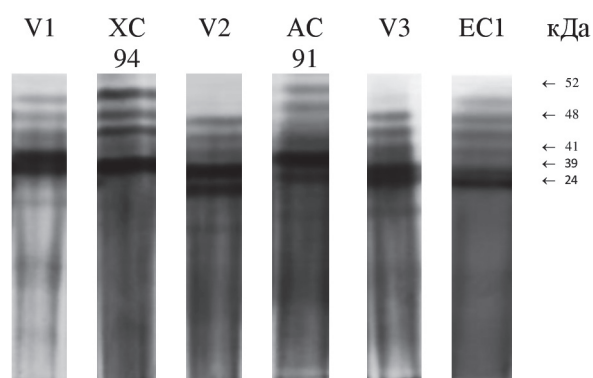


Рис. 6. Определение *in gel* активности изоформ пероксидазы в листьях картофеля, где, V1-Хозяюшка, V2-Алена, V3-Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы растений; XC-94, AC-91, EC-1, образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений. Обозначения: 52, 48, 41, 39, 24 (кДа) - молекулярные массы изопероксидаз, выраженные в кДа.

Предполагается, что разница в активности изоферментного спектра между устойчивым и восприимчивым сортами картофеля, возможна за счет разницы в механизмах активации ферментов. Возможно, у восприимчивого сорта фермент синтезировался *de novo*, в отличие от устойчивого и умеренноустойчивого сортов, у которых запускался не только механизм активации фермента *de novo*, но и происходила активация ранее существовавших молекул фермента. Результаты, полученные нами при исследовании изменения активности и спектров пероксидазы у растений картофеля при инфицировании мозаичным вирусом картофеля PVS⁰, согласуются с исследованиями

проводимыми И.А. Грасковой [27]. У устойчивого сорта Хозяюшка и его соматклонального образца происходила активация изопероксидаз, и на геле наблюдали интенсификацию окраски полос, что свидетельствовало об увеличении активности фермента, а также дальнейшему своевременному запуску сигнальных механизмов.

Результаты полученные нами показали снижение активности пероксидазы у соматклона EC1 относительно контроля, но при этом наблюдался синтез дополнительной формы фермента, что возможно связано с отличием характеристик у полученного соматклонального образца картофеля и исходного сорта Ермак, чувствительного к вирусным и бактериальным инфекциям. Предполагается, что у полученного соматклонального образца отмечается активация другого сигнального пути за счет активации антиоксидантных ферментов, например, таких как каталаза и супероксиддисмутаза. Это может привести к получению растений-регенерантов с новыми признаками, которые будут представлять интерес для селекционной работы.

Согласно данным электрофореграммы (рис. 7), в листьях картофеля контрольной группы обнаружена одна полоса активности каталазы. Она была отнесена к каталазам класса I 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 каталаз класса I составляет большую долю общей активности фермента, поэтому в нашей работе полосу с активностью в контрольной группе растений мы отнесли к каталазам класса I и обозначили ее как – Cat1 [28, 29]. В частности, класс I наиболее распространен в фотосинтезирующих тканях, которые удаляют избыток H₂O₂, 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 EC1 была обнаружена четвертая форма каталазы, которая условно обозначена как Cat3.

Полученные данные показывают, что в ответ на повышенную аккумуляцию перекиси водорода при вирусной инфекции PVS во всех изучаемых сортах картофеля происходило повышение активности каталазы. При детекции фермента в нативном геле

была обнаружена активация дополнительных изоформ, которые не были отмечали в геле контрольного варианта. Наличие нескольких изоформ каталазы было отмечено другими авторами и для таких растений как табак, фасоль, кукуруза, клевер, хлопок, сосна, арабидопсис и бесцветник [30].

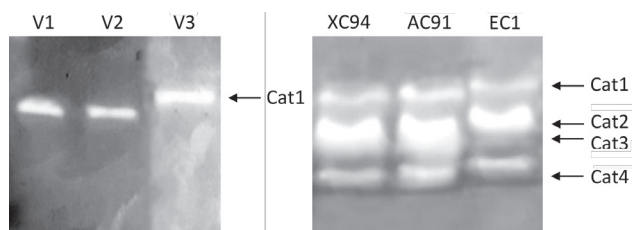


Рис. 7. Определение *in gel* активности изоформ каталазы в листьях картофеля, где, V1-Хозяюшка, V2-Алена, V3-Ермак - образцы, экстрагированные из контрольной группы растений; XC-94, AC-91, EC-1 - образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений, Cat1-Cat4 - изоформы каталазы.

Предполагается, что у полученного соматического клонового образца отмечается активация сигнального пути за счет активации других антиоксидантных ферментов, таких как каталаза и супероксиддисмутаза, который в дальнейшем может быть источником для получения регенерантов с новыми признаками в процессе проведения селекционных работ.

При определении активности SOD *in gel* выявлены в микроклонах две изоформы фермента: Fe- и Cu/Zn-SOD, которые играют наиболее значимую роль для формирования антиоксидантной системы и формирования защитного иммунитета растений (рис.8). Изоформа S1, которая не ингибировалась KCN и H₂O₂, отнесена к Mn-SOD. У контрольных и зараженных растений вирусной инфекцией активность изоформ S1 была незначительной, что согласуется с данными Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N. по определению активности изоформ SOD при низкотемпературной адаптации и солевом стрессе картофеля. Изоформа S2 ингибировалась H₂O₂ и была отнесена к изоформам Fe-SOD (рис.9). Следует отметить, что активность Fe-SOD у зараженных растений была выше по сравнению с контролем, которая проявлялась на геле более интенсивной окраской полос.

Кроме того, у соматических клонов 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 самых

высоких концентрациях KCN (3 мМ) или H₂O₂ (5 мМ). Изоформы S3 и S4 проявляли интенсивную окраску на геле, что свидетельствовало об их активности у изучаемых соматических клонов.

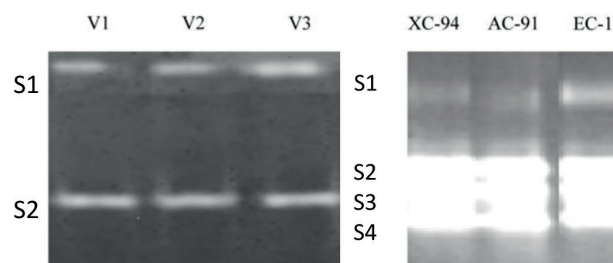


Рис. 8. Определение *in gel* активности изоформ супероксиддисмутазы в листьях картофеля, где, V1 - Хозяюшка, V2 - Алена, V3 - Ермак, образцы, экстрагированные из контрольной группы растений; XC-94, AC-91, EC-1, образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений, S1-S4 - изоформы супероксиддисмутазы.

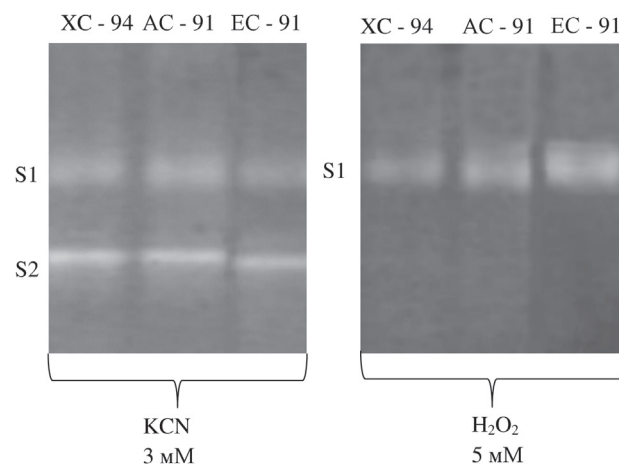


Рис. 9. Определение *in gel* изоформ супероксиддисмутазы в листьях картофеля с ингибиторами 3 мМ KCN и 5 мМ H₂O₂, где, S1 - изоформа Mn-SOD, S2 - изоформа Fe-SOD; XC-94, AC-91, EC-1 - образцы, экстрагированные из инфицированной вирусом группы растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать выводы о том, что соматические клоны, полученные путем длительно культивируемой каллусной культуры, включают в себя наборы различных характеристик, которые в дальнейшем могут быть источником хозяйственно-полезных признаков при проведении селекционных работ.

В результате исследования ответной реакции на вирусную инфекцию PVS⁰ у микроклонов *S. tuberosum* L., полученных через каллусную культуру и контрольной группы растений, была отмечена раз-

ница в активности антиоксидантных ферментов по сравнению с контролем. У микроклонов, полученных от восприимчивого сорта при заражении было обнаружено два дополнительных изозима по сравнению с контролем. Активность изопероксидаз у соматического варианта ЕС-1 увеличивалась, были обнаружены два дополнительных изофермента пероксидазы при заражении вирусом. Для умеренноустойчивого и устойчивого сортов и полученных соматических образцов АС-91 и ХС-94 количество изопероксидаз не увеличивалось, но отмечалась более интенсивная окраска у инфицированных соматических образцов. Следует отметить, что у инфицированных соматических образцов наблюдалась активность двух изоферментов (Fe- и Cu/Zn-SOD), отсутствующих у контрольных растений. При заражении вирусом у соматических образцов обнаружено наличие трех изоферментов каталазы, отсутствующих в контроле. Причем у соматического образца ЕС-1, отмечена четвертая изоформа каталазы, отсутствующая у других инфицированных образцов, но при этом общая активность каталазы у данного соматического образца была снижена по сравнению с контролем. Предполагается, что это может быть вызвано спонтанным мутагенезом у данного соматического образца полученного через длительно культивируемую каллусную культуру *in vitro* на питательной среде, содержащей 2,4 - Д и кинетин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Djaman K. // American Journal of Potato Research. 2022. Vol.1, pp.1-12. DOI: 10.1007/s12230-021-09860-1
2. World revised figures show halt in rise in potato production 2020. Режим доступа: <https://potatocongress.org/news/world-revised-figures-show-halt-in-rise-in-potato-production/> (дата обращения: 06.07.2022).
3. Киру С.Д., Рогозина Е.В. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т.21. №1. С.7–15. DOI: 10.18699/VJ17.219.
4. Спиридонов И. Нам не нужен заморский картофель. Режим доступа: <https://omskgazeta.ru/rubrika/economy/maksim-chekusov-nam-ne-nuzhen-zamorskij-kartofel/>. (дата обращения: 04.08.2022).
5. Дергачева Н.В., Согуляк С.В. // “Потенциал среднеспелых сортов картофеля селекции "Омского АНЦ" в условиях Западной Сибири”, Сборник трудов Всероссийской конференции, Омск, 2019, с.162–167.
6. Демчук И. Почему вырождаются сорта картофеля. К земле с любовью. Режим доступа: <http://journizisk.livejournal.com/3215.html> (дата обращения: 06.10.2017).
7. Костина Л.Н. // “К 80-летию мировой коллекции картофеля ВИР”, сборник трудов по прикладной ботанике, генетике и селекции, Санкт-Петербург, 2007, Т.163, с.55–81.
8. Thresh J.M. // Pests, pathogens and vegetation, 1981. Vol.1, pp. 89-107.
9. Wang B., Ma Y., Zang Z. // Crop Protection. 2011. Vol. 30, pp.1117–1123.
10. Анисимов Б.В., Еланский С.Н., Зейрук В.Н. // “Сорта картофеля, возделываемые в России”, сборник трудов РАН, ВНИИКС им. А.Г. Лорха, Москва, 2013, с.128-144.
11. Балакина А.А., Кунина Ю.В., Терентьев А.А., Калашникова Е.А. // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2012. Т.1. №2. С.78–83.
12. Ромеро В, Чередниченко А.С., Высоцкая М.Ю. // Аллоцитоплазматическая пшеница и некоторые аспекты биотехнологии растений. 2002. Т.2. С.66–73.
13. Saqib A.N., Whitney P.J. // Biomass and bioenergy. 2011. Vol.35, pp. 4748–4750.
14. Lowry O.H. // J. Biol Chem. 1951. Vol.193, pp.265–275.
15. Amanbayeva U.I., Bekturova A.Z, Tleukulova Z.B. // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology(PlantGen2019).2018. Vol.2,pp.28–28.
16. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П // Методы биохимического исследования растений. 1987. Т.2. С.428–432.
17. Giannopolitis C.N., Ries S.K. // Plant Physiol. 1977. Vol.59, pp.309–314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309
18. Laemmli U.K. // Nature. 1970. Vol. 227, pp. 680–685.
19. Handlee J.M., Scandalios J.G. // Dev. Genet. 1983. Vol.4, pp. 99–115.
20. Woodbury W., Spenser A.K., Stahmann M.A. // Anal. Biochem. 1971. Vol.44, pp.301–305.
21. Beauchamp C.H., Fridovich I. // Anal. Biochem. 1971. Vol.41, pp. 276–287.
22. Бурлов С.П., Большешапова Н.И. // “Итоги научных исследований по технологии производства высококачественного семенного материала картофеля в условиях Иркутской области”, сборник трудов Всероссийской конференции, Иркутск, 2019, с. 19–37.
23. Milavec M., Gruden K, Ravnikar M, Kovač. // Plant Pathology. 2008. Vol.57, pp.861–869.
24. Kogovsek P., Kladnik A, Mlakar J, Tusek Z.M, Dermastia M. // Phytopathology. 2011. Vol.101, pp.1292–1300.

25. Kaur, G., Sharma S., Das N. // Acta Physiol Plant. 2020. Vol.42, pp.1–11 DOI: 10.1007/s11738–019–3002–y

26. El. Кому М.Н., Saleh А.А., Ibrahim Y.E. // Trop.plant pathol. 2020. Vol.45, pp.44–55. DOI: 10.1007/s40858–019–00318–8 35.

27. Граскова И.А., Эпова К.Ю., Кузнецова Е.В., Колесниченко А.В., Войников В.К. Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 2008, Vol.4, No1, pp.4–10.

РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

*Киргизова И. В., соискатель; директор ООО «Элита»; старший преподаватель, кафедры «Биотехнология, технология общественного питания и товароведение» ФГАОУ ВО Омский государственный технический университет.

E-mail: irina.kz-89@mail.ru

Калашикова Е. А., доктор биологических наук, профессор кафедры Биотехнологии

E-mail: kalash0407@mail.ru

28. 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., Sofu // Environ. Pollut Res. 2016. pp.19002–19029.

29. Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N. // Russ.J. Plant Physiol. 2014. Vol.61, pp.332–338.

30. Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Lopez-Huertas E., Romero-Puertas M.C. // Radical Research Free. 1999. Vol. 31, pp.235–241. <https://doi.org/10.1080/10715769900301561>

RSAU-MAA named after K.A. Timiryazev

*Kirgizova I. V., competitor, director of LLC "Elite"; senior lecturer, department of "Biotechnology, catering technology and commodity science" Omsk State Technical University.

E-mail: irina.kz-89@mail.ru

Kalashnikova E. A., PhD., DSci., Full Professor of the Department of Biotechnology

E-mail: kalash0407@mail.ru

RESPONSE OF POTATO MICROCLONES (*S. TUBEROSUM* L.) TO PVS VIRUS INFECTION

I.V. Kirgizova^{1,2}, E.A. Kalashnikova¹

¹ Russian State Agrarian University - Moscow
Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev

² Omsk State Technical University

Abstract. This article presents the results of studying the activity of the potato antioxidant system in response to PVS virus infection. Potato PVS virus is the main most common and harmful virus in Omsk region that infects potatoes. Therefore, we conducted studies on the activity of antioxidant enzymes in domestic potato varieties in response to the PVS virus infection and the total content of protein and starch. That would help to carry out further breeding works to create varieties that are resistant to potato viruses, with a longer storage period of tubers and an increase in their nutritional value. The aim was to study the response of *S. tuberosum* L. microclones to the PVS mosaic virus infection. **The objects** of the study were potato varieties of Ermak, Alena and Khozyayushka of the selection of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Omsk Agrarian Research Center". We found that the ability to form calluses depended on the type of primary explant. Cultivation of leaf explants on a nutrient medium containing 2,4-D and kinetin led to the formation of callus tissue in 98–100% of cases. Moreover, in 60% of cases using stem explants in dark conditions, regardless of orientation on the nutrient medium. Regenerating plants were obtained from callus tissue. It was found that the activity of peroxidase (ROX), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) in potato microclones during PVS⁰ infection was significantly higher compared to control plants. The greatest differences in the physiological response were noted in the POX activity in the microclone (KhS-94, 4.5 μ M AA/min mg protein). The decrease of peroxidase activity was noted in the microclone (ES-1-0.75 μ M AA/min mg protein). The microclone of the virus-susceptible Ermak variety (ES-1) showed greater activity of CAT compared to other genotypes. We discovered the greatest activity of SOD in microclones (KhS-94) and the insignificant activity in microclones in the Ermak variety (ES-1). The appearance of additional isoforms in microclones obtained from the varieties of Khozyayushka and Alena showed changes in the spectrum of antioxidant enzymes. That indicated the formation of a more stable defense system in these samples in response to a viral infection. The formation of a smaller number

of isoforms of the studied enzymes in response to a viral infection in microclones obtained from the Ermak variety confirmed its susceptibility to the PVS virus infection.

The results obtained indicate different activity of the antioxidant protection system in susceptible and resistant potato varieties. The activity of antioxidant enzymes can serve as a marker sign when ranking potato samples during carrying out the breeding works.

Key words: potatoes, potato PVS virus, superoxide dismutase, catalase, peroxidase, microclones.

REFERENCES

1. Djaman K., American Journal of Potato Research, 2022, Vol.1, pp.1-12. DOI: 10.1007/s12230-021-09860-1
2. World revised figures show halt in rise in potato production 2020. Available at: <https://potatocongress.org/news/world-revised-figures-show-halt-in-rise-in-potato-production/> (accessed: 06 July 2022).
3. Kiru S.D., Rogozina E.V., Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017, Vol.21, No.1, pp.7-15. DOI: 10.18699/VJ17.219.
4. Spiridonov I. We don't need overseas potatoes. Available at: <https://omskgazeta.ru/rubrika/economy/maksim-chekusov-nam-ne-nuzhen-zamorskij-kartofel/> (accessed: 04 August 2022).
5. Dergacheva N.V., Soguljak S.V. "The potential of mid-ripening potato varieties of the "Omsk ANC" selection in the conditions of Western Siberia", Proceedings of the All-Russian Conference, Omsk, 2019, pp.162-167.
6. Demchuk I. Why do potato varieties degenerate. To the earth with love. Available at: <http://journizisk.livejournal.com/3215.html> (accessed: 06 October 2017).
7. Kostina L.N. "To the 80th Anniversary of the VIR World Potato Collection", Collection of Works on Applied Botany, Genetics and Breeding, St. Petersburg, 2007, Vol.163, pp.55-81.
8. Thresh J.M., Pests, pathogens and vegetation, 1981, Vol.1, pp. 89-107.
9. Wang B., Ma Y., Zang Z., Crop Protection, 2011. Vol. 30. pp.1117-1123.
10. Anisimov B.V., Elanskij S.N., Zejruk V.N. "Potato Varieties Cultivated in Russia", Proceedings of the Russian Academy of Sciences, VNIKH im. A.G. Lorna, Moscow, 2013, pp.128-144.
11. Balakina A.A., Kunina Ju.V., Terent'ev A.A., Kalashnikova E.A. Izvestiya vuzov. Applied Chemistry and Biotechnology, 2012, Vol.1, No2, pp.78-83.
12. Romero V, Cherednichenko A.S., Vysockaja M.Ju., Allocytoplasmic wheat and some aspects of plant biotechnology, 2002, Vol.2, pp.66-73.
13. Saqib A.N., Whitney P.J., Biomass and bioenergy, 2011, Vol.35, pp. 4748-4750.
14. Lowry O.H., J. Biol Chem., 1951, Vol.193, pp.265-275.
15. Amanbayeva U.I., Bekturova A.Z, Tleukulova Z.B., Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology (PlantGen 2019), 2018, Vol.2, pp. 28-28.
16. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Jarosh N.P., Methods of biochemical research of plants, 1987, Vol.2, pp.428-432.
17. Giannopolitis C.N., Ries S.K., Plant Physiol., 1977, Vol.59, pp.309-314. DOI: 10.1104/pp.59.2.309
18. Laemmli U.K., Nature, 1970, Vol.227, pp. 680-685.
19. Handlee J.M., Scandalios J.G., Dev. Genet., 1983, Vol.4, pp. 99-115.
20. Woodbury W., Spenser A.K., Stahmann M.A. Anal. Biochem., 1971, Vol.44, pp.301-305.
21. Beauchamp C.H., Fridovich I., Anal. Biochem., 1971, Vol.41, pp. 276-287.
22. Burlov S.P., Bol'sheshapova N.I. "Results of scientific research on the technology of production of high-quality potato seed material in the conditions of the Irkutsk region", Proceedings of the All-Russian Conference, Irkutsk, 2019, pp.19-37.
23. Milavec M., Gruden K, Ravnikar M, Kovač., Plant Pathology, 2008, Vol.57, pp.861-869.
24. Kogovsek P., Kladnik A, Mlakar J, Tusek Z.M, Dermastia M., Phytopathology, 2011, Vol.101, pp.1292-1300.
25. Kaur, G., Sharma S., Das N., Acta. Physiol. Plant., 2020, Vol.42, pp.1-11
26. El. Komy M.H., Saleh A.A., Ibrahim Y.E., Trop.plant pathol., 2020, Vol.45, pp.44-55.
27. Graskova I. A., Epova K. Yu., Kuznetsova E. V., Kolesnichenko A. V., Voynikov V. K. Journal of Stress Physiology and Biochemistry, 2008, Vol.4, No1, pp.4-10.
28. 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., Sofu // Environ. Pollut Res., 2016, pp.19002-19029.
29. Naraikina N.V., Sinkevich M.S., Demin I.N. // Russ.J. Plant Physiol., 2014, Vol.61, pp.332-338.
30. Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Lopez-Huertas E., Romero-Puertas M.C. // Radical Research Free, 1999, Vol. 31, pp.235-241.