

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

Папихин Роман Валериевич¹

кандидат с.-х. наук, доцент

Пугачёва Галина Михайловна²

кандидат с.-х. наук, доцент

Муратова Светлана Александровна³

кандидат биол. наук, доцент

Чусова Надежда Сергеевна⁴

аспирант

Никонов Кирилл Евгеньевич⁵

Аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет
г. Мичуринск, Россия

Аннотация. В статье рассматривается проблема получения безвирусного растительного материала картофеля *in vitro*. Рассмотрены современные способы устранения вирусной инфекции с помощью химических и физических факторов воздействия.

Ключевые слова: картофель, культура *in vitro*, вирусная инфекция, химиотерапия, термотерапия.

¹Папихин Р.В. paom10@mail.ru

²Пугачёва Г.М., pugacheva711@gmail.com

³Муратова С.А., smuratova@yandex.ru

⁴Чусова Н.С., chusova.nadezhda@yandex.ru

⁵Никонов К.Е., pugacheva711@gmail.com

Картофель является одной из главных пищевых культур в мире, в России он является вторым по значимости продуктом растениеводства после зерновых культур. Однако вирусные заболевания вызывают большие потери урожая картофеля, это является препятствием для устойчивого развития отраслей и пищевой и перерабатывающей промышленности [1-3].

Вирус скручивания листьев картофеля (PLRV), вирус морщинистой курчавости листьев картофеля (PVS), вирус крапчатой мозаики картофеля (PVX) и вирус мозаики полосчатой картофеля (PVY), мозаичное скручивание листьев (PVM), вирус А (PVA) являются одними из самых серьезных инфекций, наносящих серьёзный ущерб производству картофеля [5].

Установлено, что одиночная инфекция PLRV вызывает потери до 40-60%, PVS до 10-20%, PVX до 10-50% и PVY до 20-50%, смешанная инфекция с двумя вирусами приводят к значительно большему снижению урожайности, чем единичная инфекция [6].

В настоящее время сформирована целая система производства безвирусных растений многих экономически важных сельскохозяйственных культур. Такое производство необходимо для сдерживания распространения в мире вирусных заболеваний у картофеля [6], плодовых культур [7], травянистых декоративных растений [8]. Безвирусные материалы необходимы при импорте новых сортов из других стран и обмена семенным материалом между странами или регионами. Кроме того, сохранение зародышевой плазмы растений также вынуждает использовать безвирусные растения.

В настоящее время для оздоровления растений разработаны различные методы: культура меристемы, микропрививка, химиотерапия, термотерапия и криотерапия побегов.

Термотерапия с последующей культурой меристемы уничтожает PVY инфицированного картофеля. К. Аль Маарри с коллегами [9], инфильтраты, зараженные вирусом *in vitro*, подвергали термообработке в течение 40 дней при постоянной температуре 37°C, затем культивировали меристемы побегов (0,1-0,3 мм). Культура меристем побегов размером 0,1 мм приводила к выжи-

ванию около 88% обработанных побегов и 75-81% безвирусных растений в двух сортах картофеля, более крупные кончики побегов уменьшали частоту эрадикации вируса.

Увеличение длительности термотерапии приводит также к изменению частоты встречаемости в разных комбинациях вирусов и хозяина.

Добавление в питательную среду элиситоров, повышает эффективность эрадикации вируса. Так, зараженные вирусом PVX побеги культивировали *in vitro*, на среде содержащей 10^{-5} мкл салициловой кислоты в течении 4 недель. Выживаемость термически обработанных побегов (42°C, 30 дней) увеличилась с 58% до 64% и частота безвирусных растений варьировала от 75% до 98% среди семи генотипов картофеля [10].

Аналогичные результаты были также получены М. Агуилар-Комачо с коллегами [11], который применил методы, основанные на термотерапии для уничтожения вируса в побегах картофеля *in vitro*. Обработка салициловой кислотой уменьшала каталазную активность и повышала уровень перекиси водорода в побегах картофеля *in vitro*, тем самым повышая их толерантность к термотерапии. Салициловая кислота вызвала защиту растений от вирусной инфекции и повышала эффективность уничтожения вируса.

Таким образом, салициловая кислота имеет двойной положительный эффект при термотерапии для ликвидации вируса и повышению устойчивости растений к этой стрессовой нагрузке.

Типы и концентрации противовирусных агентов, используемых в химиотерапии, на основе базовой термотерапии влияют на выживаемость обрабатываемых побегов *in vitro*, регенерацию побегов и частоту уничтожения вируса.

Установлено, что оптимальная концентрация рибавирина для производства безвирусных растений картофеля составляет 20 мг/л^{-1} , инфицированного PLRV и PVY [12], Также показано, что 2-тиоурацил ($30\text{-}40 \text{ мг/л}^{-1}$) был эффективен в уничтожении PLRV у картофеля [13].

Антивирусные агенты, стерилизованные фильтром, вызывают гораздо более серьезный токсичный эффект у растений, но позволяют получать более высокие частоты безвирусных PVY растений, чем автоклавированные агенты, что указывает на то, что автоклавирование может снизить воздействие антивирусных агентов на уничтожение вируса.

Во многих случаях стерилизуют фильтрованием антивирусные агенты добавляли их к среде после автоклавирования [14], а в некоторых случаях, антивирусные агенты добавляли к среде перед автоклавированием [15-18].

Как известно, вирус распределяется неравномерно внутри растений. Поэтому размер эксплантов для культивирования и воздействия внешних противовирусных факторов является критическим для уничтожения вируса. В целом, размер используемых меристематических участков положительно связан с выживанием и регенерацией побега, в то же время, это отрицательно пропорционально частоте уничтожения вируса [19].

Размер микропобегов имеет решающее значение для уничтожения вируса, сочетание термотерапии с культурой ткани позволяет использовать более крупные участки растений для культивирования, чем те, которые используются для культивирования побегов без термотерапии [19].

Эрадикация вирусов происходит эффективнее у одноинфицированных растений, чем у заражённых несколькими вирусами [20]. После объединения термотерапии с культурой побега, Е. Кнапп с коллегами [21] обнаружили, что частота безвирусных эксплантов была намного выше у однозаражённых растений *in vitro*, чем у микс-инфицированных. Фанг с коллегами так же сообщил [22], что намного легче удалить PLRV, чем со-инфицированные PVY и PLVR. Однако до сих пор мало известно о механизме синергетического воздействия вирусов с точки зрения вирусной терапии.

Таким образом, многочисленные исследования в области получения безвирусных растений картофеля показывают эффективность разных методов эрадикация вирусной инфекции. В тоже время, очевидно, что проблема достаточно сложна и требует более детального подхода в решении создания

оздоровленного посадочного материала картофеля, поскольку залогом успеха является понимание системы хозяин-паразит в каждом конкретном случае.

Список литературы

1. Винницкая В.Ф. Разработка и создание функциональных продуктов из растительного сырья в Мичуринском государственном аграрном университете / В.Ф. Винницкая, Д.В. Акишин, О.В. Перфилова, Е.И. Попова и др. // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2013. - № 6. - С. 83-86.
2. Винницкая В.Ф. Оценка функциональных свойств малоиспользуемого местного растительного сырья и продуктов его переработки / В.Ф. Винницкая, Д.В. Акишин, О.В. Перфилова, С.И. Данилин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2017. - № 3. - С. 112-117.
3. Perfilova O.V. Quality of jelly marmalade from fruit and vegetable semi-finished products / O.V. Perfilova, V.A. Babushkin, G.O. Magomedov, M.G. Magomedov / International Journal of Pharmaceutical Research. - 2018. - V. 10. - № 4. - С. 721-724.
4. Barba M., Ilardi V., Pasquini G. Control of pome and stone fruit virus diseases. In: Loebenstein G, Katis N.I., editors. / M. Barba, V. Ilardi, G. Pasquini // Advances in virus research, vol. 91. Burlington: Academic Press; 2015. p. 47–83.
5. Brunt A.A. The main viruses infecting potato crops. In: Loebenstein G, Berger PH, Brunt A, Lawson RH, editors. / A.A. Brunt // Virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Dordrecht: Kluwer; 2011. P 65–7.
6. Wang M.R. *In vitro* thermotherapy based methods for plant virus eradication / M.R. Wang, Z.H. Cui, J.W. Li, X.Y. Hao, L. Zhao, Q.C. Wang // Plant Methods. 2018. V. 14. P. 87.
7. Папихин Р.В., Маслова М.В. Устойчивость клоновых подвоев яблони к парше на естественном инфекционном фоне / Р.В. Папихин, М.В. Маслова // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 42 (06). С. 13-22.

8. Previati A., Benelli C., Da R.F., Giannini M. *In vitro* production of virus-free chrysanthemum stock plants for cut flowers. / A. Previati, C. Benelli, R.F. Da, M. Giannini // Propag Ornament Plant. 2008. V. 8. P.167–169.

9. AlMaarri K., Massa R., AlBiski F. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. / K. AlMaarri, R. Massa, F. AlBiski // Plant Biotechnol. 2012. V. 29. P. 237–43.

10. Wang L.P. Effect of thermotherapy on elimination of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic spot virus from *in vitro*-cultured pear shoot tips. / L.P. Wang, G.P. Wang, N. Nong, R.R. Tang, X.Y. Deng, H. Zhang // HortScience. 2006;41:729–32.

11. Aguilar-Camacho M., Mora-Herrera M.E., Lypez-Delgado H.A. Potato virus X (PVX) elimination as short and long term effects of hydrogen peroxide and salicylic acid is differentially mediated by oxidative stress in synergism with thermotherapy. / M. Aguilar-Camacho, M.E. Mora-Herrera, H.A. Lypez-Delgado // Am. J. Potato Res. 2016. V. 93. P. 360–367.

12. Li B-Q. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of *Apple stem pitting virus* (ASPV) and *Apple stem grooving virus* (ASGV) from apple rootstocks ‘M9’ and ‘M26’. / B-Q. Li, C-H. Feng, L-Y. Hu, M-R. Wang, Q-C. Wang // Ann Appl Biol. 2016. V. 168. P. 142–50.

13. Singh B. Effect of antiviral chemicals on *in vitro* regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. / B. Singh // J. Crop. Sci. Biotechnol. 2015. V. 18. P. 341–348.

14. Paprštein F. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance. / F. Paprštein, J. Sedlok, L. Svobodova, J. Polak, S. Gadiou // Horticult Sci (Prague). 2013. V. 40. P. 186–190.

15. Папихин Р.В., Муратова С.А. Повышение эффективности отдалённой гибридизации семечковых плодовых культур: Монография / Р.В. Папихин, С.А. Муратова. – Мичуринск: Изд-во Мичуринского госагроуниверситета, 2011. – 116 с.

16. Муратова С.А. Потенциальные возможности адвентивного органогенеза из листовых высечек клоновых подвоев яблони / С.А. Муратова, Т.Е. Бочарова, Р.В. Папихин // Вестник МичГАУ, №1, Ч. 1, 2012. С. 54-58.

17. Муратова С. А. Влияние различных углеводов на регенерацию, размножение и рост растений *in vitro* / С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Р.В. Папихин// Плодоводство и ягодоводство России. – М., 2012. – Том XXXI, №2. – С. 86-94.

18. Muratova S.A., Papikhin R.V. The Effect of Ultrasound Irradiation on Induction of Callus Formation and Morphogenesis from the Leaf Discs of Apple Clonal Rootstocks / S.A. Muratova, R.V. Papikhin // J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 2018. V. 10(10). P. 2592-2596.

19. Faccioli G., Marani F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganzawa H, editors. Plant virus disease control. / G. Faccioli, F. Marani //St. Paul: APS Press. 1998. P. 346–380.

20. Laimer M., Barba M. Elimination of systemic pathogens by thermotherapy, tissue culture, or *in vitro* micrografting. In: Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann M, editors. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. / M. Laimer, M. Barba //St. Paul: American Phytopathological Society. 2011. P. 389–393.

21. Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Camara Machado A, Weiss B, Wang Q, Katinger H, Laimer M. New aspects of virus elimination in fruit trees. / E. Knapp, V. Hanzer, H. Weiss, A. da Camara Machado, B. Weiss, Q. Wang, H. Katinger, M. Laimer // Acta Hort. 1995. V. 386. P. 409–418.

22. Fang Y.L., Dhital S.P., Li K.H., Khu D.M., Kim H.Y., Lim H.T. Utilization of single nodal cuttings and therapies for eradication of double-infected potato viruses (PLRV and PVY) from *in vitro* plantlets of potato (*Solanum tuberosum*). / Y.L. Fang, S.P. Dhital, K.H. Li, D.M. Khu, H.Y. Kim, H.T. Lim // J. Kor. Soc. Hortic Sci. 2005. V. 46. P. 119–125.

METHODS FOR PRODUCING VIRUS-FREE POTATO IN VITRO

Papikhin R.V.¹

Candidate of agricultural sciences, associate Professor

Pugacheva G.M.²

Candidate a of gricultural sciences, associate Professor

Muratova S.A.³

Candidate of biological sciences, associate Professor

Chusova N.S.⁴

post graduate study

Nikonov K.E.⁵

post graduate study

Michurinsk State Agrarian University,

Michurinsk, Russia

Annotation. The article discusses the problem of obtaining virus-free potato plant material in vitro. Modern methods of eliminating a viral infection using chemical and physical factors of exposure are considered.

Key words: potato, in vitro culture, viral infection, chemotherapy, thermotherapy.

¹ Papikhin R.V., parom10@mail.ru

² Pugacheva G.M., pugacheva711@gmail.com

³ Muratova S.A., smuratova@yandex.ru

⁴ Chusova N.S. chusova.nadezhda@yandex.ru

⁵ Nikonov K.E., pugacheva711@gmail.com