

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ВИРУСОВ НА ОЗДОРОВЛЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Рябцева Т.В., Куликова В.И., Иванова Е.А.

ГНУ Кемеровский НИИСХ Россельхозакадемии, г. Кемерово

*В результате проведенных исследований выявлены оптимальные дозы ингибиторов вирусов Виразола, Хитозана, Интерферона для успешной регенерации меристем. Выход здоровых растений составил на сортах: Тулеевский (Хитозан 0,01 %), Удалец (Виразол 0,1 %) – 33,3 %, Танай (Интерферон 0,1 % и 0,05%) 25,0 – 50%; Любава (Интерферон 0,1 % и 0,01%) – 75 %. Увеличивается выход растений в культуре *in vitro* из микрочеренков на 1,4 – 4,4 штук, от добавления в питательную среду ингибиторов вирусов Хитозана (0,05 %), Интерферона (0,1 %, 0,05 %, 0,01 %). Оздоровление картофеля с применением ингибиторов вирусов позволило освободить от патогенов в культуре *in vitro* сорта: Каменский (Хитозан 0,1 %, Интерферон 0,01 %) - М; Сирень (Виразол 0,01 %) – S, М, Y; Тулеевский (Интерферон 0,1; 0,05; 0,01 %) – Y; Красавчик (Виразол 0,01 %) – X, S, М.*

Для повышения эффективности оздоровления в настоящее время применяются биотехнологические методы, в частности метод культуры ткани сочетают с химиотерапией, предусматривающей использование веществ, обладающих антивирусными свойствами. Противовирусной активностью обладает антибиотик имманин, выделяемый из зверобоя; препараты из растений ланопоса, коланхоэ; ингибитор полисахаридной природы, полученный из дрожжей, и др. По данным В.И. Огаркова, И.Г. Атабекова (1987) человеческий интерферон подавляет репродукцию вирусов картофеля X (ХВК), М (МВК), Y (YBK), в среднем на 75-90 %. Одним из эффективных ингибиторов вируса картофеля является препарат ДГТ – 2-, 4- диоксогексагидро-1-,3-,5-триазин, синтезированный в Германии (Schuster, 1984). В.А. Шмыгля, К.В. Попкова (1980) сообщают о том, что препарат ДГТ способствует оздоровлению картофеля без использования культуры апикальной меристемы [1]. Высокая антивирусная активность установлена для Рибовирина (Виразола) (Зубкевич, Сильванович, Блоцкая, 1996; Коновалова, Родькин, 1997; Коновалова, 2001) [2]. По данным Е.А. Симакова и других авторов (2000) применение РНК-азы в концентрации 0,001 – 0,1 % повышает приживаемость меристем в зависимости от сорта на 10-35%, количество продуктивных регенерантов – на 30 – 40 % и более [3].

Однако не все вещества находят применение на практике из-за своей фитотоксичности. Использование этих веществ допустимо при условии, что они не окажут губительного действия на клетки растений и не приведут к изменению их генетического аппарата. Поиск химиотерапевтических веществ избирательно действующих на вирусную инфекцию, и не оказывающих угнетающего действия на растения, продолжается.

Целью работы являлось – провести сравнительную оценку различных ингибиторов вирусов картофеля и выявить оптимальную концентрацию для освобождения от патогенов в культуре *in vitro*.

Исследования проведены в отделе селекции и семеноводства картофеля ГНУ Кемеровского НИИСХ, путем постановки опытов в лабораторных условиях (2011 – 2012 г.г.) Объекты исследования – ингибиторы вирусов картофеля Виразол, Хитозан, Интерферон применяемые в следующих дозах – 0,01 %; 0,05 %; 0,1 %; сорта картофеля, пораженные вирусами в культуре *in vitro*: Тулеевский – Y; Танай а). (X, S), б). (X, S, Y), в). Y; Любава – Y; Удалец – Y; Красавчик - (X, S, M); Сирень - (X, S, M, Y); Каменский - (M).

Визуальная оценка роста и развития растений в культуре *in vitro* по методике ВНИИКХ (1991) [4]. Диагностика вирусных и бактериальных болезней по методическим рекомендациям Кемеровского НИИСХ, (2004) [5]. Инструкция по применению иммуноферментного диагностического набора для определения возбудителей вирусов и бактериозов картофеля (2011) [6].

Важным звеном в технологии оздоровления является подбор оптимальных питательных сред, способствующих успешной регенерации меристем, а также максимальному выходу здоровых растений. Изучаемые сорта различно отреагировали на добавление ингибиторов вирусов (таблица 1).

Таблица 1 - Приживаемость меристем, %, 2011 – 2012 гг.

| Вирусы, содержащиеся в клубнях картофеля | Вариант | | | | | | |
|--|----------|-------------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| | Контроль | Виразол 0,01 % | Хитозан 0,1% | Хитозан 0,01 % | Интерферон 0,1 % | Интерферон 0,05 % | Интерферон 0,01 % |
| Тулеевский | | | | | | | |
| У | 0 | 0 | 0 | 33,3 | - | - | - |
| Удалец | | | | | | | |
| У | 0 | 33,3 | 0 | 0 | - | - | - |
| Танай | | | | | | | |
| У | 0 | - | - | - | 25,0 | 25,0 | 0 |
| (X+S+M),У | 0 | - | - | - | 0 | 50,0 | 0 |
| Любава | | | | | | | |
| У | 50,0 | - | - | - | 75,0 | 0 | 75,0 |

Применение ингибиторов вирусов, на изучаемых сортах: Тулеевский, Удалец, Танай, Любава оказывает стимулирующее действие на выход регенерантов. Приживаемость меристем повышается с добавлением в питательную среду Виразола (0,01 %), Хитозана (0,1 %; 0,01 %), Интерферона (0,01 – 0,01 %) на 25 – 50 %, в зависимости от сорта (таблица 1).

Основной метод ускоренного размножения – микроклональное черенкование *in vitro*. Главное требование к среде – обеспечение высокого коэффициента размножения, то есть максимального выхода растений из микрочеренков в минимальные сроки.

Применение противовирусного препарата Виразол отрицательно влияет на развитие растений сортов: Красавчик, Каменский, Сирень, Тулеевский, в культуре *in vitro*. При первом черенковании на питательной среде с добавлением Виразола 0,1 % растения картофеля всех сортов не давали побегов из пазух листа и корешков. При дальнейшем черенковании на всех вариантах растения не развивались.

Добавление в питательную среду Хитозана в концентрации 0,05 %, увеличивает высоту растений до 47 %, число междоузлий от 1,0 до 2,1, при этом количество нестандартных растений (ветвистых, отстающих в росте, без корешков) уменьшается до 29 % (таблица 2).

Таблица 2 - Характеристика растений *in vitro*, в зависимости от доз ингибиторов вирусов в питательной среде, среднее за 2011 - 2012 гг.

| Сорт | Вариант | Высота растений, см | Количество междоузлий, штук | Выбраковано растений, % |
|------------|-------------------|---------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Красавчик | контроль | 6,3 | 5,2 | 33,7 |
| | Хитозан 0,05 % | 7,6 | 5,3 | 16,2 |
| | Интерферон 0,01 % | 9,7 | 7,7 | 8,3 |
| Каменский | контроль | 6,1 | 3,8 | 45,1 |
| | Хитозан 0,05 % | 8,7 | 5,7 | 31,2 |
| | Интерферон 0,05 % | 13,0 | 8,2 | 0 |
| Сирень | контроль | 5,5 | 4,1 | 56,2 |
| | Хитозан 0,05 % | 8,1 | 5,1 | 26,8 |
| | Интерферон 0,1 % | 9,1 | 6,3 | 8,3 |
| Тулеевский | контроль | 9,6 | 5,8 | 38,9 |
| | Интерферон 0,1 % | 15,9 | 8,0 | 0 |
| | Интерферон 0,05 % | 14,9 | 7,2 | 0 |

Отмечено нормальное развитие растений (увеличение высоты растений, количества междоузлий, снижение выбракованных растений) при добавлении в питательную среду Интерферона (0,1 %, 0,05, 0,01 %).

При каждом черенковании проводится анализ на пораженность вирусами методом иммуноферментного анализа с фиксированием результатов анализов фотометром. Оптическое поглощение для положительных проб должно минимум в три раза превышать поглощение для отрицательных проб: $P = 3X$, где P - порог достоверности положительных результатов, X - значение оптической

плотности для отрицательного контроля. Образцы имеющие оптическую плотность $A_{(490)} \leq 2 X$ считать отрицательными [6].

Результаты иммуноферментного анализа показали, что действие препарата Хитозан (0,01 – 0,1 %), на растения *in vitro* сорта Красавчик полностью подавляет вирусную инфекцию S и M. При выращивании на питательной среде с добавлением Виразола (0,01 %) получены растения свободные от вирусов картофеля X, S и M.

При выращивании растений сорта Сирень на питательной среде с добавлением ингибиторов вирусов после первого черенкования по результатам ИФА отмечалось снижение оптической плотности исследуемых проб на всех вирусах. После второго черенкования в растениях не обнаружены вирусы: S, M, Y, в варианте с использованием Виразола (0,01 %), вирус – Y, при добавлении в питательную среду 0,05 % раствора Интерферона.

Растения сорта Каменский выращенные на питательной среде с добавлением Хитозана (0,1 %) и Интерферона (0,01 %) освободились от вируса M, что подтверждено результатами иммуноферментного анализа.

При черенковании растений сорта Тулеевский выращенных на питательной среде с добавлением ингибитора вирусов Интерферона в различных концентрациях, уже после первого черенкования наблюдалось достоверное снижение концентрации вируса Y в соке анализируемых растений. Данная тенденция отмечалась и в последующих черенкованиях.

Заключение

Для успешной регенерации меристем, выявлены оптимальные дозы ингибиторов вирусов Виразола, Хитозана, Интерферона. Выход здоровых растений составил на сортах: Тулеевский (Хитозан 0,01 %), Удалец (Виразол 0,1 %) – 33 %, Танай (Интерферон 0,1 %, 0,05 %) 25 – 50 %; Любава (Интерферон 0,1 % и 0,01 %) – 75 %.

От добавления в питательную среду ингибиторов вирусов Хитозана (0,05 %), Интерферона (0,1 %, 0,05 %, 0,01 %) увеличивается выход растений в культуре *in vitro* из микрочеренков изученных сортов на 1,4 – 4,4 штук.

Оздоровление картофеля с применением ингибиторов вирусов позволило освободить от патогенов в культуре *in vitro* сорта: Каменский (Хитозан 0,1 %, Интерферон 0,01 %) – M; Сирень (Виразол 0,01 %) – S, M, Y; Тулеевский (Интерферон 0,1; 0,05; 0,01 %) – Y; Красавчик (Виразол 0,01 %) – X, S, M.

Список литературы:

1. Болезни картофеля // К.В. Попкова, Ю.И. Шнайдер, А.С. Воловик, В.А. Шмыгля. – М.: Колос, 1980. – 304 с.
2. Блоцкая Ж.В. Вирусные болезни картофеля. – Минск: Наука и техника, 1993. – 222 с.
3. Симаков Е.А. Новые технологии производства оздоровленного исходного материала в элитном семеноводстве картофеля // М.: 2000. – 80 с.
4. Методы оценки оздоровленных сортов и меристемных линий в элитном семеноводстве картофеля. НИИКХ – М. – 1991. – 39с.
5. Диагностика вирусных и бактериальных болезней картофеля в оригинальном семеноводстве: Методические рекомендации/ Сост. В. И. Куликова и др. Сиб. отд-ние РАСХН, ГНУ «Кемеровский НИИСХ». – Кемерово: «Кузбассвузиздат», 2004. – 24 с.
6. Инструкция по применению иммуноферментного диагностического набора для определения возбудителей вирусов и бактериозов картофеля ВНИИКХ. – Коренево, 2011. – 9 с.