

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСА В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ *CHENOPODIUM QUINOA* С ЦЕЛЬЮ НАКОПЛЕНИЯ S-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ

Хасанов Т.Т., Абышева Г.Т., Жанабекова А.К.

Аннотация

В статье представлены результаты отбора естественно зараженных клонов картофеля, полученны на основе методов ИФА и ПЦР. Установлена 100%-я каллусообразующая способность стеблевых и листовых эксплантов *Chenopodium quinoa* на питательной среде Мурасиге и Скуг с различным соотношением ауксин/цитокинин. Моноинфицированный PVS клон картофеля сорта Тустеп послужил источником инокуляции каллусных культур *Chenopodium quinoa* in vitro. Выявлено, что культивирование вируса в рыхлых каллусных тканях тест-растений происходит неравномерно. Максимальный титр S-вируса картофеля (1:1280) установлен в инфекционном соке первичного каллуса. Титр S-вируса картофеля, культивируемого в каллусной ткани 5-го пассажа исследуемых тест-растений снижался в 2-8 раз по сравнению с исходным моноинфицированным клоном картофеля.

Ключевые слова: S-вирус картофеля (PVS), *Chenopodium quinoa*, in vitro, инокуляция, каллус, иммуноферментный анализ (ИФА).

Введение

S-вирус картофеля вызывает различные симптомы – от полного отсутствия признаков заражения на растениях до бронзовости листьев. При проявлении заболевания отмечаются слабая морщинистость и складчатость листьев, их общее посветление, глубокое жилкование, иногда краевой некроз и ложечковидная деформация листьев [1,2]. Заражение вирусами PVS снижает урожайность на 10-20% [2]. При совместном заражении вирусами M, X и S снижение урожая увеличивается на 15-45% [3].

В настоящее время без применения в семеноводческой практике методов диагностики растений на вирусоносительство невозможно получение высоких урожаев картофеля. Наличие качественного антигена является ключевым звеном при разработке современных методов диагностики и внедрении их в сельскохозяйственную практику. Известно, что высокоочищенные вирусные антигены, которыми иммунизируют животных, применяются для производства специфических антител. Тогда как

специфические антитела являются важными компонентами диагностических наборов для проведения иммунодиагностики.

В связи с этим, с целью оптимизации методики выделения антигенов поиск альтернативных подходов к технологии накопления и очистки вирусов картофеля является весьма актуальным. Использование каллусной ткани растений может служить одним из подходов - в качестве источника для получения вирусных препаратов.

Применение технологии *in vitro* позволяет получать сырье круглый год, увеличивать выход биологически активных веществ, вирусных препаратов и регулировать их накопление в культуре ткани. Получение и наращивание каллусной ткани растений с одновременным накоплением в ней вируса дает возможность длительно сохранять материал в условиях *invitro*, исключающих заражение другим вирусом. Выделение вирусных антигенов из каллусной ткани позволяет не только получить высокоочищенные препараты ввиду отсутствия многих специфических белков, а также накапливать достаточное количество антигена независимо от времени года [4,5].

Известно, что растениями-накопителями (растениями, развивающими локальные поражения S-вируса картофеля при определенных условиях являются *Chenopodium quinoa*, *C. Amaranticolor* и *Gomphrenagloboza* [6].

В зарубежной литературе имеются сведения о 2 штаммах (обычный или PVS^O, и Андийский, PVS^A) S-вируса картофеля, что основывается на реакции растений-индикаторов. Однако, последние исследования обнаружили третий штамм S-вируса картофеля, именуемый как PVS^O-like, или PVS^O-подобный штамм. При инокуляции растений *Chenopodium quinoa* 44-мя различными изолятами S-вируса картофеля, собранных из семян картофеля в различных географических регионах 19 изолятов были охарактеризованы как PVS^O на основании развития локальных поражений листьев *Chenopodium quinoa* лишь в местах инокуляции. Три изолята идентифицированы как PVS^O на основании появления слабой пятнистости на инокулированных листьях и хлорозных пятен на неинокулированных листьях *Chenopodium quinoa* [7].

Кроме того, известно, что вышеуказанные изоляты S-вируса картофеля встречаются в растениях *Chenopodium quinoa* как в отдельности так и в комплексе (PVS^O+PVS^A) [8].

В этой связи целью настоящих исследований являлось изучение динамики накопления S-вируса картофеля в каллусных культурах *Chenopodium quinoa*.

Настоящие исследования проводились в лаборатории биотехнологии растений кафедры защиты и карантина растений АО «КАТУ им. С. Сейфуллина» в рамках бюджетной программы 055 «Научные и /или научно-

техническая деятельность» по проекту МОН РК: «Создание банка отечественных штаммов вирусов

картофеля для производства высокочувствительных диагностических тестов».

Материалы и методика исследований

Объектами исследований послужили: S-вирус картофеля растения *Chenopodium quinoa*.

При проведении ИФА применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха РАСХН (п. Коренево). Для иммунологической проверки растений на вирусносительство применялся метод двойного наложения антител («сэндвич» - вариант) ИФА по стандартной методике [9]. Наличие вируса в исследуемых образцах регистрировали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света ASYSExpert 96 (Австрия) при длине волны 492 нм.

Сортообразцы тест-растений и картофеля были исследованы методом классического ПЦР на наличие X-, S-, Y и M- вирусов картофеля по стандартной методике [10].

ПЦР-анализ проводили на базе НИИ биотехнологии АО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина», согласно прилагаемой инструкции.

Выделение РНК: РНК из образцов выделяли с помощью набора Агродиагностика «НК-Агро».

Для проведения анализа на содержание возбудителей вирусов картофеля использовали комплекты реагентов для проведения обратной транскрипции РНК и ПЦР

амплификации кДНК фитопатогенных вирусов (формат «Форез») производства «ООО «Агродиагностика», Россия» на приборе для ПЦР Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) согласно инструкции производителя.

Тест-растения выращивали из семян на биогумусе «Живая земля» с почвогрунтом в соотношении 1:1. Выращивание растений проводилось при постоянном освещении с интенсивностью 1500 лк, при температуре 24-25°C.

Работы с культурой изолированных тканей растений проводились в соответствии со стандартной методикой [11, 12]. Для получения первичной культуры каллуса использовались молодые листья и стебли *Chenopodium quinoa*, которые отделяли и промывали дистиллированной водой. Для дезинфекции эксплантов использовали обработку раствором хлорамина (5%, 20%, 30%) в течение 10 минут, 70% этанола в течение 2 минут с последующей 3-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Листья разрезали на сегменты квадратной формы размером 0,6–0,7 мм, стебли разрезали длиной 0,8–0,9 мм.

Экспланты высаживали в чашки Петри с агаризованной питательной средой на минеральной основе по Мурасиге и Скугу (MS),

содержащей наряду со стандартными ингредиентами следующие компоненты: кинетин — 1,0; 2,0; 3,0 мг/л, 2,4-Д - 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 мг/л, сахарозу - 2% и агар-агар — 0,7%. Каллус выращивали в условиях постоянного освещения (1500 лк), при температуре 25–26°С и 70%-ной относительной влажности воздуха. Пассирование каллуса на свежую питательную среду осуществлялось через каждые 28-30 дней.

Инокуляцию каллусных культур исследуемых тест-растений осуществляли с помощью нанесения инфекционного сока пробирочных растений картофеля сорта Тустеп

Основные результаты исследований НИР

На первом этапе исследований проводили поиск естественно зараженных клонов картофеля для использования в качестве инокулята при искусственном заражении тест-растений. С этой целью образцы различных сортов картофеля, отобранные в хозяйствах Северного и Центрального Казахстана проверяли на наиболее распространенные вирусы методами иммуноферментного и ПЦР-анализа

Результаты отдельных электрофореграмм ПЦР-продуктов приведены в таблице 1 с целью

Таблица 1 – Результаты оценки образцов картофеля на зараженность вирусами методом ОТ-ПЦР в сравнении с данными «сэндвич-варианта» ИФА

№ пробы в ПЦР	Исследуемые сортообразцы	Зараженность PVS по результатам ИФА, экстинция A ₄₉₂ , о.е.	Результат ПЦР на наличие вирусов, +/-				Отобран для инокуляции / выбракован
			PVS	PVM	PVX	PVY	
6	Тамыз №3	2,496	+	-	-	-	для инокуляции
8	Фортуна №2	2,144	+	-	-	-	для инокуляции

(образец №68) в надрезы ткани *Chenopodium quinoa*, предварительные сделанные скальпелем. Инфекционный сок получали в стерильных условиях гомогенизацией листьев инфицированных растений картофеля в стерильном 0,01М фосфатном буфере (рН 7,4) в пропорции 1:1. [13].

Полученную вирусосодержащую суспензию наносили на каллус с помощью стерильной пипетки с последующими надрезами ткани скальпелем. Инокулированные каллусные культуры культивировали в термостате при температуре 24-26°С и относительной влажности 60-70%.

сравнения с данными ИФА и определения моноинфицированных образцов картофеля.

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что большинство изучаемых сортов картофеля подтвердили зараженность одним S-вирусом картофеля. Однако остальные образцы картофеля (Такома №5, Такома №11, Пароли №1, Тамыз №19), за исключением свободного от вирусной инфекции сорта Акжол №46, содержали комплекс из 2-3-х вирусов.

11	Акжол №46	1,976	-	-	-	-	выбракован
12	Акжол №34	1,069	+	-	-	-	для инокуляции
13	Акжол №25	1,001	+	-	-	-	для инокуляции
14	Такома №11	2,270	+	+	-	-	выбракован
21	Такома №5	1,115	+	+	-	+	выбракован
15	Пароли №1	1,125	-	+	-	+	выбракован
16	Тамыз №19	2,496	+	-	+	-	выбракован
22	Тустеп 68	1,145	+	-	-	-	для инокуляции
3	Невский 38	1,123	+	-	-	-	для инокуляции
8(1)	Артемис 93	1,090	+	-	-	-	для инокуляции
К+	положительный контроль	1,140	+	+	+	+	-
К-	отрицательный контроль	0,037	-	-	-	-	-
Примечание - «+» - положительный результат; «-» - отрицательный результат.							

Таким образом, в результате проведенного тестирования были идентифицированы моноинфицированные PVS клоны картофеля.

В дальнейших исследованиях для инокуляции тест-растений был использован образец картофеля Тустеп 68, остальные клоны поддерживали в коллекции отечественных штаммов вирусов картофеля АО «КАТУ им. С. Сейфуллина» с помощью вегетативного размножения.

Как известно при массовом производстве диагностических сывороток иммуногеном могут служить не только инфицированные растения, но и каллусы растений-накопителей. Культивирование фитовирусов в культуре клеток позволяет иметь достаточное количество антигена независимо от времени года и получать гомогенный инфекционный материал, свободный от загрязнения другими вирусами и пигментами [4].

Ранее отдельными исследователями [4, 14]

проводилось изучение накопления вирусов картофеля на таких культурах как: *D.stramonium*, *N.glutinosa*, *N.tabacum* - для PVX, *N.glutinoza*, *N.debney*, *Nicandraphysaloides*, *Ch.amaranticolor*, *Ch.album*, *Licum barbarum* - для PVY-вирусов, *S.tuberosum*, *L.eisculentum* - для PVS и PVM. Как было указано выше, имеются сообщения зарубежных исследователей [8] о применении *Chenopodium quinoa* в качестве растения-индикатора для определения штаммов PVS однако вопросы стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro* и накопления данного вируса в каллусной ткани является малоизученными.

В проводимых исследованиях с целью перевода эксплантов *Chenopodium quinoa* и культивирования каллуса *in vitro* изучали различные режимы стерилизации (таблица 2).

Таблица 2 – Изучение оптимальных режимов стерилизации листовых и стеблевых эксплантов *Chenopodium quinoa*, при введении их в культуру изолированных тканей растений

Вариант стерилизации	Исходное количество листовых эксплантов, шт.		Количество стерильных эксплантов, шт.		Выход стерильных жизнеспособных эксплантов, %	
	листья	Стебли	Листья	стебли	листья	стебли
15% гипохлорит Na- 10 минут, 70% спирт – 2 минуты	45	29	33	23	73,7	79,4
20% гипохлорит Na– 10 минут, 70% спирт – 2 минуты	45	60	35	55	78,1	91,6
30% гипохлорит Na-20 минут, 70% спирт – 2 минуты	45	47	13	30	29,0	64,3
НСР _{0,5}					8,25	13,57
m%					3,95	4,99

Из таблицы 2 следует, что среди изучаемых вариантов стерилизации выход жизнеспособных эксплантов *in vitro* составлял от 64,3 до 91,6%. Листовая ткань в большей степени была подвержена некротизации и контаминации, чем стеблевая. Данный факт может быть объяснен повышенной

чувствительностью нежных листовых эксплантов к стерилизующим агентам, а также площадью поверхности,

На рисунке 1 представлены результаты каллусообразующей способности листовых и стеблевых эксплантов растений *Chenopodium quinoa* на различных питательных средах

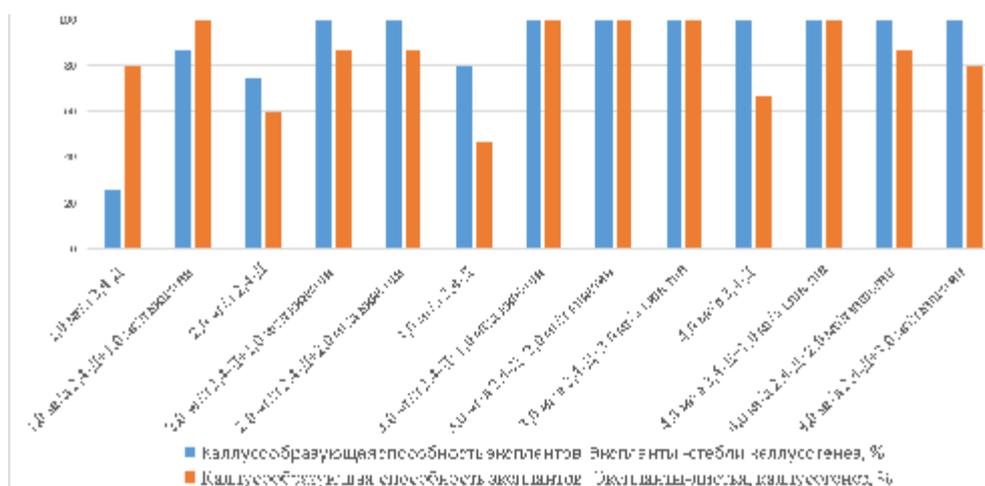


Рисунок 1 - Каллусообразующая способность различных эксплантов растений *Chenopodium quinoa* в зависимости от соотношения ауксин/цитоканин в питательной среде

Появление каллуса из 18 день, на стеблевых эксплантах - на 21 день. Высокая частота

каллусообразования наблюдалась в широком диапазоне концентраций 2,4-Д и кинетина. Максимальная частота каллусообразования стеблевых эксплантов выявлена преимущественно на вариантах сред с содержанием 2,4-Д в концентрациях 2-4 мг/л независимо от изучаемых концентраций кинетина (1-3 мг/мл) или на вариантах с добавлением 2,4-Д (4 мг/л) в отдельности.

Максимальная частота каллусообразования листьев *Chenopodium quinoa* отмечена на 5 вариантах изучаемых питательных сред с добавлением 2,4-Д и

кинетина в соотношениях: 1:1, 3:1, 3:2, 3:3 и 4:1 соответственно.

На следующем этапе исследований проводили инокуляцию первичного каллуса изучаемого тест-растения.

Изучение динамики накопления вируса в культуре каллусной ткани *Chenopodium quinoa* осуществляли в течение 5 пассажей длительностью 4 недели, контролируя относительную концентрацию PVS в виде оптической плотности (экстинции) иммуноферментного анализа (таблица 3).

Таблица 3-Динамика накопления S-вируса картофеля в каллусных культурах *Chenopodium quinoa*

№ пассажа	Номер линии	Оптическая плотность ИФА при A ₄₉₂ , о.е.		
		Образец	Positive	Negative
P1	83	1,539	2,174	0,060
P2	83/1	0,212	2,800	0,008
	83/3	0,145	2,800	0,008
P3	83/1/1	0,846	0,717	0,019
P4	83/1/1/1	0,370	0,851	0,028
	83/1/1/2	0,276	0,851	0,028
	83/1/1/3	0,236	0,851	0,028
	83/1/1/4	0,472	0,851	0,028
	83/1/1/5	0,952	0,851	0,028
	83/1/1/6	0,510	0,851	0,028
	83/1/1/7	0,448	0,851	0,028
	83/1/1/8	0,903	0,851	0,028
	83/1/1/9	0,545	0,851	0,028
	83/1/1/10	0,155	0,851	0,028
	83/1/1/11	0,228	0,851	0,028
	83/1/1/12	0,128	0,851	0,028
	83/3/1	0,211	0,851	0,028
	83/3/2	0,150	0,851	0,028
83/3/3	0,191	0,851	0,028	
P5	83/1/1/1	2,011	0,473	0,020
	83/1/1/2	0,067	0,473	0,020
	83/1/1/3	0,388	0,473	0,020
	83/1/1/4	1,631	0,473	0,020
	83/1/1/5	1,547	0,473	0,020
	83/1/1/6	0,689	0,473	0,020
	83/1/1/7	2,916	0,473	0,020
	83/1/1/8	0,504	0,473	0,020
	83/1/1/9	1,408	0,473	0,020

	83/1/1/10	0,196	0,473	0,020
	83/1/1/11	0,077	0,473	0,020
	83/1/1/12	0,088	0,473	0,020
	83/3/1	0,615	0,473	0,020
	83/3/2	0,771	0,473	0,020
	83/3/3	1,058	0,473	0,020

Как видно из таблицы 3, относительная концентрация вируса в каллусных тканях изучаемого тест-растения распространялась неравномерно в течение 5 пассажей.

Известно, что основным показателем, влияющим на выход вирусного препарата является титр

вируса в инфекционном соке тест-растения. В этой связи на заключительном этапе исследований определялся рабочий титр PVS в инфекционном соке инфицированных каллусов тест-растений *Chenopodium quinoa* в сэндвич-варианте ИФА (таблица 4).

Таблица 4 – Результаты изучения рабочего титра S-вируса картофеля, культивируемого в каллусных тканях *Chenopodium quinoa* в течение четырех пассажей, «сэндвич-вариант» ИФА

Вид растения / сорт, линия	№ цикла микроочистки / пассажа	Титр вируса в тест-растении									
		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
<i>S. tuberosum</i> , Тустеп	Контроль	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. quinoa</i>	1-й	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. quinoa</i> 83/1/1/4	5-й	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. quinoa</i> 83/1/1/9	5-й	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ch. quinoa</i> 83/1/1/5	5-й	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Как видно из таблицы 4, титр PVS, был максимально высоким в каллусных культурах *Chenopodium quinoa* у первичного каллуса, превышая контрольный вариант (исходное растение-донор PVS), однако к пятому пассажу титр вируса в 16-64 раза снижался по отношению к первичному каллусу.

Обсуждение полученных данных и заключение

В целом полученные результаты соответствовали данным отдельных исследователей, которыми на примере было установлено, что первичная рыхлая каллусная ткань более инфицирована и с последующим ее культивированием концентрация многих вирусов снижается, что зависит не только от свойств вируса, но и от интенсивности

роста каллуса. Так, рыхлые каллусные ткани различных видов табака (*N. Glutinosa*, *N. tabacum*) были способны сохранять X-вирус картофеля в течение 5-14 месяцев, Y-вирус картофеля - в течение 5-6 месяцев, а плотные каллусные ткани дурмана с замедленным ростом сохраняли вирус в течение 48 месяцев и более [4,14].

Таким образом в результате проведенных исследований были отобраны оптимальные параметры культивирования S-вируса картофеля в культуре каллусной ткани *Chenopodium quinoa*. Полученный инфекционный сок первого пассажа *Chenopodium quinoa*, который послужит антигеном для иммунизации лабораторных животных и получения специфических антител.

На основании проведенных исследований необходимо сделать следующие выводы:

1 На основе методов ИФА и ПЦР отобраны естественно зараженный PVSклон картофеля сорта Тустеп с целью инокуляции тест-растений.

2 Установлена 100%-я каллусообразующая способность стеблевых эксплантов *Chenopodium quinoa* на питательной среде Мурасиге и Скуга с содержанием 2-4 мг/л 2,4-Д и 1-3 мг/л кинетина. Максимальный каллусогенез листовых эксплантов выявлен на средах с 2,4-Д и кинетином в соотношениях концентраций: 1:1, 3:1, 3:2, 3:3 и 4:1 мг/л соответственно.

3 Проведена инокуляция каллуса *Chenopodium quinoa* PVSin vitro. Культивирование вируса врыхлых каллусных тканях тест-растений происходит неравномерно. Титр S-вируса картофеля в инфекционном соке первичного каллуса *Chenopodium quinoa* в 8 раз превышает титр вируса в соке исходного моноинфицированного клона картофеля, в 2-6 раз превышающего титр PVS каллусных культур 5-го пассажа.

Новизна и практическая значимость полученных результатов исследований заключается в том, что на основе высокочувствительных методов диагностики из сортов картофеля, возделываемых в Северном и Центральном регионах Казахстана отобраны местные изоляты S-вируса, которые будут использованы для штаммовой идентификации. Полученный первичный каллус может послужить источником вирусного антигена при получении реагентов иммунодиагностических тестов.

Список литературы

- 1 Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля. - Ленинград «Колос». - 1976. - 152 с.
- 2 Анисимов Б.В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля. Практическое руководство. - Москва. - 2004. - С. 80 с.
- 3 Токбергенова Ж.А. Инновационные технологии в семеноводстве картофеля Казахстана. - Алматы: ЖШС «Таугуль – Принт» баспасы. - 2015. - 204 с.
- 4 Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений. - Москва «Наука». - 1993. - 301 с.

5Хасанов В.Т., Бейсембина Б., Алексеев Я.И. и др. Культура ткани *Nicotiana tabacum* как источник Y-вирус картофеля // Биотехнология. Теория и практика, 2014. – №4. – С. 22-29.

6 Вирусные болезни и семеноводство картофеля. Под ред. Ю.И. Власова. Москва «Колос». – 1976. -248 с.

7 Lambert S.J., Scott J.B., Hay F.S., Pethybridge S.J. Strain characterization of Potato virus S isolates. - Tasmania, Australia. - 2012. - P. 813-819.

8 Jinghui Wang, Fanye Meng, Ruhao Chen, Jun Liu, Dr. Xianzhou Nie, Dr. Bihua Nie. RT-PCR differentiation, Molecular and Pathological Characterization of Andean 2 and Ordinary Strains of Potato virus S in Potatoes in China. Plant Disease "FirstLook" paper. -2016. -P. 34.

9Симаков Е.А., Усков А.И., Ворицев Ю.А. Новые технологии производства исходного оздоровленного материала в элитном семеноводстве картофеля: рекомендации. – М., 2000. - 76 с.

10 Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю. Сохранение вегетативно размножаемых культур в invitro и криоколлекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. – СПб: ВИР РАСХН, 2011. – 54 с.

11Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Лабораторный практикум посельскохозяйственной биотехнологии. - М. : Колос, 2006. - 144 с.

12Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. - 272 с.

13Методические рекомендации по применению иммуноферментного анализа для диагностики вирусов картофеля под ред. И.Г. Атабекова, А.Ф. Бобковой, Н.М. Нацвлишвили, Москва. - 1985. - 20 с.

14 Лялько Р.В., Использование культуры растительных тканей для получения диагностических антисывороток к некоторым мозаичным вирусам картофеля. Автореферат. Москва, 1987. –17с.

Түйін

Мақалада жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде картоптың моноинфекциялы PVS клондары алынғандығы көрсетілген. *Chenopodium quinoa* каллус ұлпасында картоптың S-вирусын культуралаудың оңтайлы параметрлері жасалды. Құрамында 2,4–Д және кинетиннің әр түрлі мөлшері бар Мурасиге-Скуг жасанды қоректік ортасында *Chenopodium quinoa* сабак және жапырақ экспланттарының каллустүзушілік қабілеті 100% болатыны анықталды. *Chenopodium quinoa* өсімдігінің каллусының шырыны вирустың максималды титірін көрсетті.

Summary

The results of research on the identification of monoinfected PVS of potato clones was considered in this article. Optimum parameters of cultivation of Potato

virusS in callus culture of *Chenopodium quinoa* were defined. 100% callusogenesis of *Chenopodium quinoa* stems and leaves exsplants on the Murashige and Skoog medium with different ratio of 2,4-D and kinetin was observed. The maximum titer of the virus in *Chenopodium quinoa* primary callus sap was established.