

<https://doi.org/10.15407/frg2019.02.147>

УДК 634.737:581.19:522.4(476)

ВЛИЯНИЕ ХИТОЗАНА НА ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС, ФЕРМЕНТЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ИНФИЦИРОВАНИЕ X-ВИРУСОМ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) НА ИСКУССТВЕННЫХ ИОНООБМЕННЫХ СУБСТРАТАХ IN VIVO

Т.Г. ЯНЧЕВСКАЯ¹, Н.В. ШАЛЫГО², А.Л. ОЛЬШАНИКОВА¹, А.Н. ГРИЦ¹,
Т.Б. МАКАРОВА¹, Е.Н. ОЛЕШУК¹, Е.Н. КАРАСЕВА¹, Е.И. РЫБИНСКАЯ¹,
Е.А. ФИЛИПЧИК², Т.Г. КАЛЯГА²

¹*Институт экспериментальной ботаники имени В.Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси*

220072 Минск, ул. Академическая, 27

e-mail: t_yanch@mail.ru

²*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси*

220072 Минск, ул. Академическая, 27

Приведены экспериментальные данные, указывающие на опосредованную защиту от X-вируса рассады картофеля, выращиваемой на ионообменном субстрате, в состав которого входит элиситор хитозан в концентрациях 1, 5 и 10 г/л. Исходно до заражения X-вирусом опытные растения характеризовались повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК) и более высоким антиоксидантным статусом (содержанием восстановленного аскорбата). После инфицирования защита картофеля от X-вирусного заражения реализовалась через повышение содержания фенольных соединений, активности фенольной пероксидазы и уровня экспрессии гена гиперчувствительности. Полученные данные могут быть использованы при защите исходного материала картофеля в процессе микроклонирования и получения мини-клубней в системе первичного семеноводства картофеля по ионитопонной технологии.

Ключевые слова: безвирусный семенной картофель, антиоксиданты, стресс, экспрессия генов устойчивости, ионообменный субстрат, in vivo, оптимизация.

В условиях микроклимата искусственных экосистем поддержание высокой продуктивности исходного материала картофеля (мини-клубней) зависит от плодородия субстратов, используемых в защищенном грунте, оптимизации физических факторов (влажность воздуха и грунта, освещенность, температура) и защиты от инфекции [1]. Существующие способы защиты все меньше удовлетворяют требованиям экологической безопасности. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется экологически безопасным средствам защиты растений, среди которых важное место занимают пре-

параты (салициловая кислота, жасмоновая кислота, хитозан, брассиностероиды, микробиологические препараты и др.), стимулирующие системную индуцированную устойчивость растений картофеля к широкому спектру патогенов.

Данные индукторы болезнеустойчивости относятся к числу наиболее экологичных химических средств защиты непрямого (небиоцидного) действия, оказывающих влияние на возбудителей болезней через усиление в растениях природных реакций болезнеустойчивости, защищая их на длительное время от возможного заражения вирусами и другими патогенами, в том числе при микроразмножении растений *in vitro*, адаптации их *in vivo* и получении из них мини-клубней картофеля. Анализ литературы по данной проблеме свидетельствует об эффективности некоторых элиситоров из микробиологических культур [2, 3], соединений-индукторов болезнеустойчивости биохимической природы в оздоровлении растений картофеля от вирусов. Элиситоры хитозан и салициловая кислота уже нашли практическое применение в качестве средств защиты растений *in vitro* от вирусов [4]. Среди противовирусных препаратов наиболее перспективными для практического применения в оригинальном семеноводстве картофеля могут быть соединения-индукторы вирусоустойчивости растений, действующие на возбудителей болезней через усиление в растениях природных реакций болезнеустойчивости, защищающие их на длительное время от возможного заражения вирусами и другими патогенами.

Основная задача таких исследований заключалась в многофакторном эксперименте по оптимизации условий получения безвирусного клубневого поколения картофеля при пересадке микроклонированных растений в оптимизированный по агрохимическому составу и агрофизическим свойствам ионообменный субстрат многоразового использования, максимизируя целевую функцию — снижение накопления вегетативной массы при одновременном ускорении столоно- и клубнеобразования *in vivo* в условиях защищенного грунта в биотехнических комплексах при искусственном освещении [1, 5].

Целью данной работы было создание условий для поддержания безвирусности исходного материала картофеля на протяжении всего периода вегетации в защищенном грунте на искусственных ионообменных субстратах путем использования элиситора хитозана как индуктора системной устойчивости в составе компонентов самого субстрата торговой марки «Триона®», разработанного в Институте экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси.

Методика

Реакции растений на действие хитозана в составе ионообменного субстрата изучались с использованием арсенала современных методов по тестированию окислительного статуса, изменению активности ферментов окислительного метаболизма и экспрессии защитных генов, а также по степени вирусной инфекции (X-вирус) растений картофеля.

Объектом исследования служила рассада картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Уладар (белорусской селекции), выращиваемая в

искусственном ионообменном субстрате торговой марки «Триона®» с использованием искусственных источников света [8]. Хитозан вносили в предварительно высушенный субстрат из расчета 1, 5 и 10 г на 1 л. Контролем служил ионообменный субстрат без добавления хитозана. Растения размещались на биотехнических комплексах БТК-1, разработанных в Институте экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси, в режиме вегетации с фотопериодом 16/8 ч (день/ночь) и влажностью 60–70 % ПВ. Для анализа АФК и компонентов антиоксидантной защиты использовали четвертый лист 16- и 30-суточных растений картофеля, для анализа динамики вирусной инфекции и отдельных компонентов защитной системы — 4-й лист в течение трех недель после заражения рассады картофеля X-вирусом. Инокуляция растений картофеля X-вирусом проводилась в 30-суточном возрасте согласно методике [9].

Определение активных форм кислорода. Общий уровень АФК определяли в экстрактах растений картофеля с помощью зонда — 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетата, способного окисляться АФК до флуоресцирующего продукта дихлорфлуоресцеина [10]. Содержание пероксида водорода определяли с помощью флуоресцентного метода, основой которого является реакция окисления скополетина при наличии H_2O_2 , катализируемая пероксидазой хрена [11].

Определение активности антиоксидантных ферментов. Активность аскорбатпероксидазы (АПР) определяли в грубом ферментном препарате по [12], используя реакцию восстановления пероксида водорода аскорбатом. Реакцию запускали приливанием 20 мкл H_2O_2 . Кинетику потребления аскорбата регистрировали в течение 20 с при 290 нм на спектрофотометре Uvikon 931 (Германия). Активность фермента рассчитывали по коэффициенту экстинкции $2,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [13].

Активность глутатионредуктазы (ГР) анализировали по методу, описанному в работе [14]. Реакцию запускали добавлением 75 мкл 5 мМ НАДФН⁺. Определение активности ГР основано на измерении скорости снижения оптической плотности при длине волны 340 нм, обусловленной окислением НАДФН⁺, кинетику потребления которого регистрировали в течение 10 мин на спектрофотометре Uvikon 931 (Германия). Активность ГР рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $6,22 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [12, 14].

Активность фенольной пероксидазы определяли, как описано в работе [15]. Количественное определение белков проводили по методу Бредфорд [17].

Определение низкомолекулярных антиоксидантов. Содержание восстановленного аскорбата определяли по работе [18], используя коэффициент молярной экстинкции $8,7 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [19], количество восстановленного глутатиона — по работе [20], общее количество водорастворимых фенольных соединений — как описано в работе [21].

Определение уровня экспрессии гена гиперчувствительности. Уровень экспрессии гена гиперчувствительности (*HSR*) определяли с помощью ПЦР-анализа в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого из листьев картофеля выделяли общую РНК с помощью реагента TRIzolTM (AppliChem, Германия) по протоколу фирмы. На матрице РНК синтезировали кДНК, используя реакцию обратной транс-

крипции с применением обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони. Синтез кДНК проводили с использованием Revert Aid^H Minus First Strandc DNA Synthesis Kit «ThermoScientific» в амплификаторе MJMini (Bio-Rad, США). Расчет и дизайн праймеров, специфичных к гену *HSR*, проводили самостоятельно, используя последовательности мРНК данного гена, найденные в базе данных «Nucleotide» NCBI. Затем с помощью программы «VectorNTI» подбирали праймеры, исходя из критериев: наименьшее количество шпилек, дуплексов, оптимальное соотношение GC-пар и минимальные различия температур плавления. Рассчитанные праймеры для гена *HSR* имели следующую последовательность нуклеотидов: (F) 5–GGTCCACCCGAAGTCAAGTT–3 и (R) 5–AGAGGGAGGAA-GACGGAGAC–3. Праймеры синтезировали в лаборатории ДНК-праймеров Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Реакционная смесь для ПЦР-РВ общим объемом 10 мкл содержала (в расчете на 1 пробу): а) 1 мкл кДНК; б) 20 пмоль каждого праймера; в) 4 мкл 2,5х реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ при наличии EVA Green «Синтол»; г) 4 мкл H₂O. При отработке условий амплификацию с кДНК проводили при разных температурах отжига: от 55 до 60 °С. Количество циклов амплификации — 40–50. Полученные результаты обработаны в программе Bio-Rad CFX Maestro.

Фитовирусы картофеля определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием антител и конъюгатов по стандартной методике [22]. Анализировали листовую материал растений *in vivo* картофеля. Листья (навеску массой 2–3 г) измельчали в ступке и разбавляли буфером для проб и конъюгатов в соотношении 1/10 (масса/объем). Антигены определяли «сэндвич»-вариантом ИФА, используя стандартные иммуноферментные диагностические наборы для определения вирусов картофеля (производитель Всероссийский институт картофельного хозяйства, пос. Коренево Московской обл.) путем адсорбирования на поверхности лунок полистирольных плат (0,1 мл рабочего раствора антител) и инкубировали в течение ночи при +4 °С или 2 ч при +37 °С в термостате. Несвязавшиеся антитела из планшета удаляли, затем в лунки вносили тестируемый материал и иммуносорбент (0,1 мл рабочего раствора конъюгата), инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. На следующем этапе в лунки вносили конъюгат антител с пероксидазой хрена (по 0,1 мл свежеприготовленного раствора субстрата) и инкубировали для развития окраски при комнатной температуре в течение 20–30 мин, после чего реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 0,05 мл 3 М раствора H₂SO₄. Количество связавшегося с антигеном конъюгата (пропорционально содержанию антигена в пробе) определяли фотометрическим методом. Результаты ИФА оценивали с помощью иммуноферментного анализатора АФИ-М/430 («Витязь 430», Беларусь) при $\lambda = 492$ нм.

Оптическое поглощение положительных проб должно превышать среднее поглощение отрицательных проб на величину трехкратного стандартного отклонения отрицательных проб:

$$P = X + 3E,$$

где P — порог достоверности положительных результатов; X — среднее значение при $\lambda = 492$ нм для отрицательного контроля; $3E$ —

трехкратное значение максимального положительного отклонения при $\lambda = 492$ нм от среднего в отрицательном контроле.

Оптическая плотность зараженных патогеном образцов при $\lambda = 492$ нм (D_{492}) превышала 0,120 отн. ед.

Исходная культура картофеля, зараженная X-вирусом, полученная из коллекции Всероссийского института картофельного хозяйства (пос. Коренево Московской обл.) поддерживается в Институте экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича НАН Беларуси.

Статистическая обработка полученных результатов. Основными статистическими характеристиками служили: среднеарифметическая величина (\bar{x}), среднеквадратическое отклонение (σ), погрешность средней величины (S_x) и достоверность отличий между средними величинами (t). Среднеарифметическую величину определяли по формуле

$$\bar{x} = \Sigma x_i / n,$$

где Σx_i — сумма всех n -повторностей измерения.

Для получения среднеквадратического отклонения использовалось выражение

$$\sigma = \sqrt{\Sigma (x_i - \bar{x})^2 / n - 1},$$

где $\Sigma (x_i - \bar{x})^2$ — сумма квадратов отклонений от среднеарифметической величины. Погрешность средней величины находили по формуле

$$S_x = \sigma / \sqrt{n}.$$

Все эксперименты проводили в трехкратной биологической повторности.

Результаты и обсуждение

Индукция неспецифической устойчивости растений с помощью хитозановых элиситоров становится одним из перспективных способов защиты сельскохозяйственных культур от грибных, бактериальных и вирусных болезней. Для хитозана, который является гетерополимером, в силу специфики его получения, характерна структурная неоднородность, что сказывается на его иммуномодулирующих свойствах, зависящих от особенностей структуры полимера.

На первом этапе нашей работы был изучен окислительный потенциал 16- и 30-суточной рассады картофеля, выращиваемой на ионообменном субстрате, содержащем 1–10 г/л хитозана. Установлено, что этот показатель зависит от возраста растений и концентрации хитозана, внесенного в ионообменный субстрат. В частности, в 16-суточной рассаде картофеля опытных вариантов общий уровень АФК, а также содержание пероксида водорода возрастали по мере повышения концентрации хитозана (рис. 1). В 30-суточной рассаде общий уровень АФК и H_2O_2 в растениях, выращиваемых на ионообменном субстрате с добавлением хитозана, оказался значительно ниже по сравнению с 16-суточными растениями. При этом в варианте с использованием 1 г/л хитозана количество АФК и H_2O_2 в рассаде было ниже соответствующего контроля (см. рис. 1).

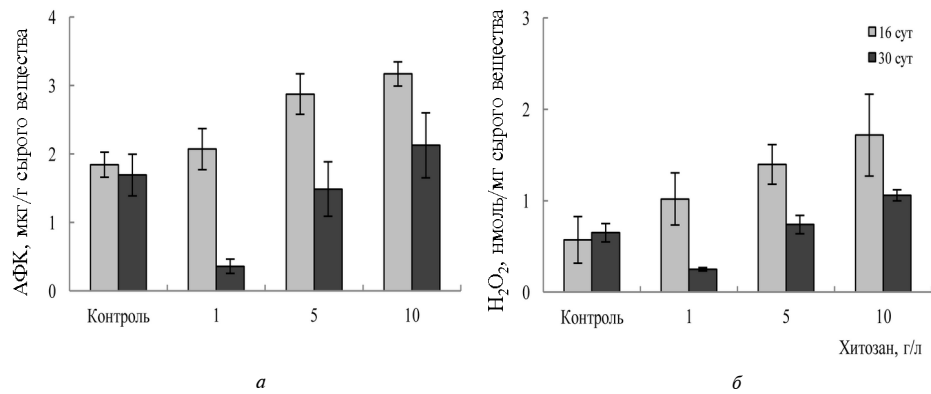


Рис. 1. Общий уровень активных форм кислорода (а) и пероксида водорода (б) в листьях 16- и 30-суточной рассады картофеля, выращенной в субстрате, содержащем 1, 5 и 10 г/л хитозана. Контроль — без добавления хитозана

Анализ аскорбат-глутатионового цикла, в котором происходит детоксикация H₂O₂, показал, что повышение содержания последнего в 16-суточной рассаде опытных вариантов четко соответствует снижению активности АПР, для 30-суточной рассады такая закономерность менее выражена (рис. 2, а).

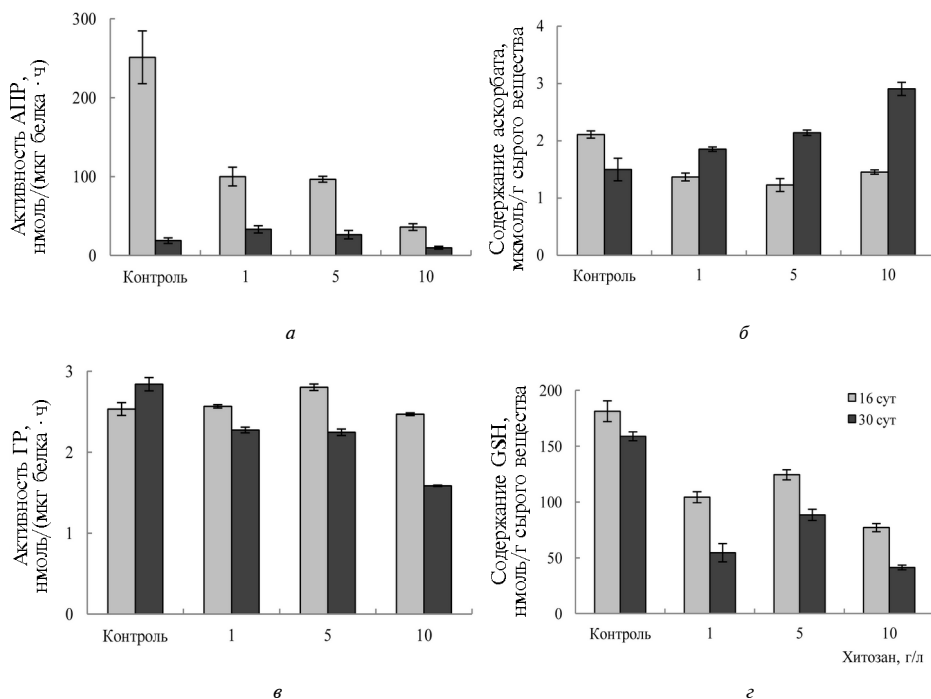


Рис. 2. Активность аскорбатпероксидазы (а), содержание восстановленного аскорбата (б), активность глутатионредуктазы (в), содержание восстановленного глутатиона (г) в листьях 16- и 30-суточной рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем 1, 5 и 10 г/л хитозана. Контроль — без добавления хитозана

Уровень восстановленного аскорбата, который является субстратом для АПР, в 16-суточной рассаде опытных вариантов был ниже контрольного значения, а в 30-суточных опытных растениях, напротив, выше, особенно в варианте с использованием 10 г/л хитозана (см. рис. 2, б). Повышенный уровень восстановленного аскорбата в растениях опытных вариантов на фоне снижения активности АПР может указывать на его потребность в клетках не только как компонента аскорбат-глутатионового цикла в системе детоксикации пероксида водорода, но и как низкомолекулярного антиоксиданта, принимающего участие в химическом тушении свободных радикалов и АФК [23].

Количество восстановленного глутатиона (GSH) в 16-суточной рассаде опытных вариантов снижалось относительно контроля, в 30-суточных растениях уровень GSH еще более снижался по мере возрастания концентрации хитозана в ионообменном субстрате, что указывает на активное потребление в таких условиях этого низкомолекулярного антиоксиданта (см. рис. 2, з). Пониженный уровень GSH в растениях опытных вариантов обусловлен также снижением в таких условиях активности ГР (см. рис. 2, в) — фермента, который пополняет пул GSH путем восстановления его окисленной формы.

На втором этапе работы 30-суточную рассаду картофеля заражали X-вирусом и в течение трех недель анализировали компоненты защитной системы, принимающей участие в формировании устойчивости, изучали содержание водорастворимых фенолов, активность фенольной пероксидазы и уровень экспрессии гена гиперчувствительности.

Показано, что в первую неделю после инфицирования рассады картофеля вирусом содержание водорастворимых фенолов в растениях опытных вариантов было практически на уровне контроля (рис. 3, а). Через 2 недели в зараженных растениях в вариантах с использо-

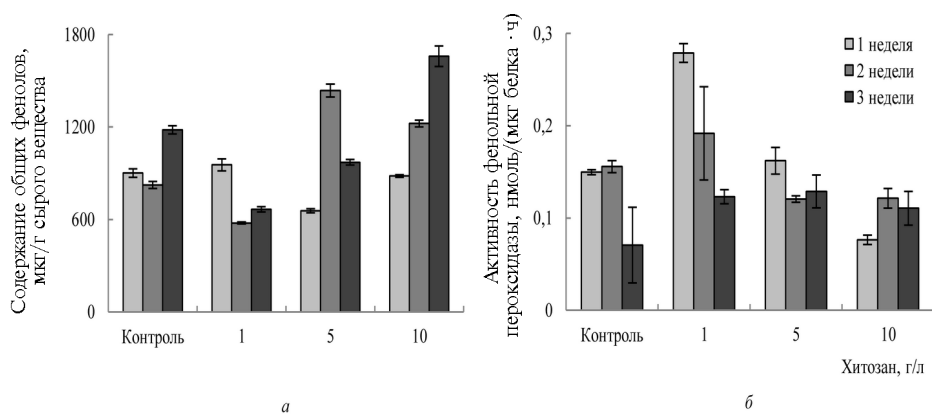


Рис. 3. Содержание водорастворимых фенолов (а) и активность фенольной пероксидазы (б) в листьях рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем хитозан в концентрациях 1, 5 и 10 г/л и зараженной X-вирусом. Контроль — без добавления хитозана

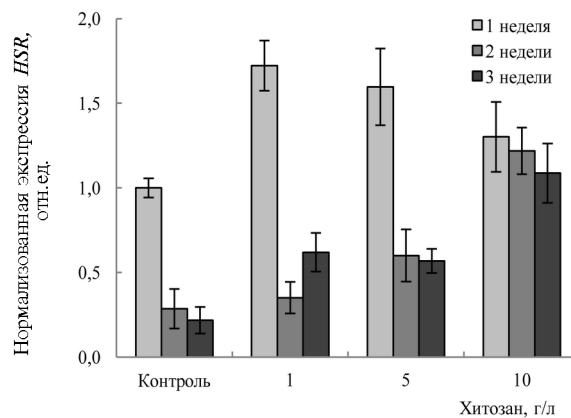


Рис. 4. Уровень экспрессии гена гиперчувствительности (*HSR*) в листьях рассады картофеля, выращенной на субстрате, содержащем хитозан в концентрациях 1, 5 и 10 г/л и зараженной *X*-вирусом. Контроль — без добавления хитозана

ванием 5 и 10 г/л хитозана регистрировалось увеличение количества фенолов, через 3 недели после заражения повышенное содержание фенолов отмечалось только у растений одного варианта — 10 г/л хитозана.

Анализ фенольной пероксидазы через 1 неделю после инфицирования показал, что резкое возрастание активности фермента (практически в 2 раза по отношению к контролю) регистрируется в опытном варианте с использованием 1 г/л хитозана. Повышенный уровень фенольной пероксидазы в растениях в первую неделю после заражения обнаруживается также в варианте с 5 г/л хитозана. Через 2 и 3 недели после заражения активность фенольной пероксидазы во всех опытных вариантах оказалась практически одинаковой и превышала контрольные значения на 170 % (см. рис. 3, б).

Через 1 неделю после заражения рассады картофеля вирусами в ней резко повышался уровень экспрессии гена гиперчувствительности, отвечающего за быстрый ответ клетки на проникновение патогена (рис. 4). Через 2 и 3 недели после заражения в контроле экспрессия гена гиперчувствительности снижалась в 3—5 раз. В вариантах с добавлением хитозана 1 и 5 г/л уровень экспрессии *HSR* также снижался, однако оставался выше контроля в 1,7 раза. В опытных растениях, выращиваемых на ионообменном субстрате с добавлением 10 г/л хитозана, экспрессия *HSR* оставалась высокой по отношению к контролю и другим опытным вариантам даже через 3 недели после инфицирования.

В результате определения фитовирусов картофеля установлено, что при добавлении хитозана в состав ионообменного субстрата в инфицированной рассаде картофеля, растущей на нем, регистрируется снижение оптической плотности при $\lambda = 492$ нм в вытяжках из листьев, пропорциональное уменьшению титра вируса. Проявляется

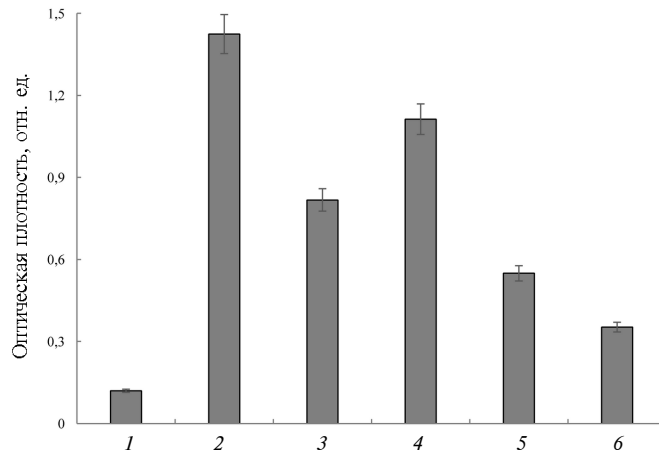


Рис. 5. Титр *X*-вирусов в листьях растений картофеля сорта Уладар через 16 сут после инфицирования:

1 — контроль безвирусный; 2 — контроль, зараженный *X*-вирусом; 3 — хитозан (1 г/л) + *X*-вирус; 4 — хитозан (5 г/л) + *X*-вирус; 5 — хитозан (10 г/л) + *X*-вирус; 6 — положительный контроль инфицирования

этот процесс, уже начиная с концентрации хитозана в составе ионообменного субстрата 1 г/л, при которой титр вируса снижается на 40 %, а при концентрации хитозана 5 г/л — на 25 %. Концентрация хитозана 10 г/л в составе ионообменного субстрата действовала на защиту от вирусной инфекции наиболее выражено, при этом уменьшение поглощения при 492 нм, пропорциональное содержанию *X*-вируса картофеля, составило около 60 % (рис. 5).

Как видно из представленных данных, степень развития вирусной инфекции в рассаде картофеля согласуется с активностью защитной системы до и после инфицирования. Так, исходно (до заражения *X*-вирусом) рассада картофеля, выращиваемая на ионообменном субстрате с добавлением хитозана в концентрации 1–5 г/л, характеризовались более высоким уровнем восстановленного аскорбата (см. рис. 2) — низкомолекулярного антиоксиданта, принимающего участие в ферментативной детоксикации пероксида водорода в аскорбат-глутатионовом цикле и в химическом тушении АФК и свободных радикалов. При этом содержание восстановленного аскорбата в опытных растениях картофеля возрастало относительно контроля по мере повышения содержания хитозана в субстрате. Важно отметить, что исходно рассада опытных вариантов (5–10 г/л хитозана) содержала повышенное количество АФК по сравнению с контролем (см. рис. 1), играющих важную роль в формировании устойчивости растительных организмов к стрессорам разной природы [4]. Через 1 неделю после заражения рассады, выращенной на субстрате с добавлением 1–10 г/л хитозана, в ней резко возрастал уровень экспрессии гена гиперчувствительности (см. рис. 4), который отвечает за быструю реакцию клетки на про-

никновение патогенов. Кроме того, растения, выращиваемые на ионообменном субстрате с добавлением хитозана 5 и 10 г/л, имели повышенный уровень фенольных соединений (см. рис. 3, а). Известно, что между содержанием фенолов и активностью фенольной пероксидазы — фермента, участвующего в лигнификации клеточной стенки, наблюдается обратная зависимость, т. е. чем выше активность фермента, тем ниже уровень фенольных соединений [25]. Однако в наших экспериментах рассада картофеля после заражения X-вирусом характеризовалась не только повышенным содержанием фенолов, но и более высокой активностью фенольной пероксидазы (см. рис. 3, б), особенно через 1 неделю после инфицирования в варианте с использованием 1 г/л хитозана. Это свидетельствует о важной роли фенольных соединений и активности фенольной пероксидазы в формировании реакции растения на инфицирование X-вирусом.

Таким образом, полученные результаты дают основание говорить об опосредованной защите от X-вируса рассады картофеля, выращиваемой на ионообменном субстрате, в состав которого входит элиситор хитозан, по антистрессовому механизму [23], реализуемому через генерацию АФК, активацию антиоксидантного статуса и повышение активности защитной системы, в частности, увеличение уровня фенольных соединений, активности фенольной пероксидазы и экспрессии гена гиперчувствительности.

Приведенные данные могут быть использованы при защите исходного материала картофеля в процессе микроклонирования и получения мини-клубней в системе первичного семеноводства картофеля по ионитопонной технологии.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ по договору № Б17 КИГ-003 от 20.07.2017 г.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Янчевская Т.Г. Оптимизация минерального питания растений. Минск: Беларуская навука, 2014. 458 с.
2. Янчевская Т.Г., Гриц А.Н., Коломиец Э.И., Романовская Т.В., Яруллина Л.Г., Ибрагимов Р.И., Цветков В.О. Стимулирование клеточных механизмов анти-вирусной устойчивости картофеля при действии препарата на основе бактерий *Bacillus subtilis*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. **54**, № 3. С. 304–312.
3. Yanchevskaya T.G., Grits A.N., Kolomiets E.I., Romanovskaya T.V., Yarullina L.G., Ibragimov R. I., Tsvetkov V.O. Stimulation of cellular mechanisms of potato antiviral resistance by the action of a preparation based on *Bacillus subtilis* bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018. **54**, N 3. P. 324–330.
4. Тютерев С.Л. Научные основы индуцированной болезнестойкости растений. Санкт-Петербург: ВИЗР, 2002. 328 с.
5. Янчевская Т.Г. Физиолого-биохимическая оптимизация минерального питания растений. Saarbrücken: Lambert, 2018. 549 с.
6. Айзенберг Ю.Б. Справочная книга по светотехнике. Москва: Энергоатомиздат, 1983. 472 с.

7. Протасова Н.И. Спектральные характеристики источников света и особенности роста растений в условиях искусственного освещения. *Физиология растений*. 1990. **37**, вып. 2. С. 386–395.
8. Инструкция по применению светодиодных источников: Государственное предприятие «ЦСОТ НАН Беларуси». Минск: LEDcenter.by, 2016. 25 с.
9. Хасанов В.Т., Муранец А.П., Оразбаева Г.К., Букаев А.И. Инокуляция, накопление и идентификация вируса PVY картофеля в тест-растениях *Nicotiana tabacum*. *Вестн. КАТУ им. С. Сейфуллина*. 2012. N 4 (75). С. 31–36.
10. Crow J.P. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine1 23 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1997. **1**, N 2. P. 145–157.
11. Mohanty J.G., Jaffe J.S., Schulman E.S. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J. Immunol. Methods*. 1997. **202**, N 2. P.133–141.
12. Aono M., Saji H., Fujiyama K., Sugita M., Kondo N., Tanaka K. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol*. 1995. **107**. P. 645–648.
13. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1981. **22**, N 5. P. 867–880.
14. Aono M., Kubo A., Saji H., Aatori N., Tanaka K., Kondo N. Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol*. 1991. **32**, N 5. P. 691–697.
15. Gechev T., Willekenes H., Van Montagu M. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol*. 2003. **160**. P. 509–515.
16. Юсупова З.Р., Хайруллин Р.М., Максимов И.В. Активность пероксидазы в различных клеточных фракциях при инфицировании пшеницы *Septoria nodorum* Berk. *Физиология растений*. 2006. **53**, N 6. С. 910–917.
17. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976. **72**. P. 248–254.
18. Law M.Y., Charles S. A., Halliwell B. Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochem. J*. 1983. **210**, N 3. P. 899–903.
19. Nakano Y., Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*. 1981. **22**, N 5. P. 867–880.
20. Шалыго Н.В., Щербаков Р.А., Доманская И.Н. Спектрофлуориметрический метод определения, окисленного и восстановленного глутатиона в растениях. *Физиология и биохимия культ. растений*. 2007. **39**, N 3. С. 264–270.
21. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. Москва: Наука, 1993. 272 с.
22. Инструкция по использованию иммуноферментного диагностического набора для определения вирусов картофеля. Москва: Коренево, 2011. 8 с.
23. Sanmartin M., Drogoudi P., Lyons T. Overexpression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*. 2003. **216**. P. 918–928.
24. Хайруллин Р.М., Юсупова З.Р., Трошина Н.Б. Защитные реакции пшеницы при инфицировании грибными патогенами. 2. Активация анионных изоформ пероксидазы в проростках пшеницы при инфицировании спорами Tilletiacaries. *Физиология растений*. 2000. **47**, N 1. С. 114–119.
25. Чесноков Ю.В. Устойчивость растений к патогенам. *С.-х. биология*. 2007. N 3. С. 16–35.

Получено 20.11.2018

REFERENCES

1. Yanchevskaya, T.G. (2014). Optimization of plants mineral nutrition. Minsk: Belaruskaja navuka [in Russian].
2. Yanchevskaya, T.G., Gric, A.N., Kolomic, E.I., Romanovskaja, T.V., Jarullina, L.G., Ibragimov, R.I. & Cvetkov, V.O. (2018). Stimulation of Cellular Mechanisms of Potato Antivirus Resistance by the Action of a Preparation Based on *Bacillus subtilis* Bacteria. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija*, 54, No. 3, pp. 304-312.
3. Yanchevskaya, T.G., Gric, A.N., Kolomic, E.I., Romanovskaja, T.V., Jarullina, L.G., Ibragimov, R. I. & Tsvetkov, V.O. (2018). Stimulation of Cellular Mechanisms of Potato Antivirus Resistance by the Action of a Preparation Based on *Bacillus subtilis* Bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54, No. 3, pp. 324-330.
4. Tiuterev, S.L. (2002). Scientific basis of induced disease resistance of plants. SPb: VISR [in Russian].
5. Yanchevskaya, T.G. (2018). Physiological and Biochemical Optimization of Mineral Nutrition of Plants. Saarbrücken: Lambert [in Russian].
6. Ajzenberg, Ju.B. (1983). Handbook on Illumination Technics. Moscow: Energoatomizdat [in Russian].
7. Protasova, N.I. (1990). Spectral characteristics of light source and characteristics of growth of plants in conditions of artificial lighting. *Plant Physiol.*, 37, Is. 2, pp. 386-395 [in Russian].
8. Instructions for the use of LED sources (2016): State Enterprise "CSOT NAN Belarusi". Minsk: LEDcenter.by [in Russian].
9. Khasanov, V.T., Muranec, A.P., Orazbayeva, G.K. & Bukayev, A.I. (2012). Inoculation, accumulation and identification of the potato virus PVY in test plants *Nicotiana tabacum*. *Vestn. KATHU*, No. 4 (75), pp. 31-36 [in Russian].
10. Crow, J.P. (1997). Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine1 23 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*, 1, No. 2, pp. 145-157.
11. Mohanty, J.G., Jaffe, J.S. & Schulman, E.S., (1997). A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J. Immunol. Methods*, 202, No. 2, pp. 133-141.
12. Aono, M., Saji, H., Fujiyama, K., Sugita, M., Kondo, N. & Tanaka, K. (1995). Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.*, 107, pp. 645-648.
13. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, No. 5, pp. 867-880.
14. Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Aatori, N., Tanaka, K. & Kondo, N. (1991). Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol.*, 32, No. 5, pp. 691-697.
15. Gechev, T., Willekenes, H. & Van Montagu, M. (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant Physiol.*, 160, pp. 509-515.
16. Jusupova, Z.R., Hajrullin, R.M. & Maksimov, I.V. (2006). Peroxidase activity in various cellular fractions in infected *Septoria nodorum* Berk. wheat. *Fiziologija rastenij*, 53, No. 6, pp. 910-917 [in Russian].
17. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, pp. 248-254.
18. Law, M. Y., Charles, S. A. & Halliwell, B. (1983). Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and paraquat. *Biochem. J.*, 210, No. 3, pp. 899-903.
19. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, 22, No. 5, pp. 867-880.

20. Shaligo, N.V., Shcherbakovm, I.N. & Domanskaja, I.N. (2007). Spectrofluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in plants. *Fiziologia i biokhim. kult. rastenij*, 39, No. 3, pp. 264-270 [in Russian].
21. Zaprometov, M.N. (1993). Phenolic compounds: distribution, metabolism, and function in plants. Moscow [in Russian].
22. Instructions on the use of enzyme immunoassay diagnostic kit for the determination of potato viruses: (2011). Moscow: Korenevo [in Russian].
23. Sanmartin, M., Drogoudi, P. & Lyons, T. (2003). Overexpression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, 216. pp. 918-928.
24. Hajrulín, R.M., Jusupova, Z.R. & Troshina, N.B. (2000). Protective reactions of wheat when infected with fungal pathogens. 2. Activation of anionic peroxidase isoforms in wheat seedlings when infected with spores of tilletiacaries. *Fiziologia rastenij*, 47, No. 1, pp. 114-119 [in Russian].
25. Chesnokov, Ju. V. (2007). Plant resistance to pathogens. *Agricult. biology*, No. 3, pp. 16-35 [in Russian].

Received 20.11.2018

ВПЛИВ ХІТОЗАНУ НА ОКИСНЮВАЛЬНИЙ СТАТУС, ФЕРМЕНТИ
ОКИСНЮВАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ІНФІКУВАННЯ Х-ВІРУСОМ
РОСЛИН КАРТОПЛІ (*SOLANUM TUBEROSUM* L.) НА ШТУЧНИХ
ІОНООБМІННИХ СУБСТРАТАХ IN VIVO

*Т.Г. Янчевська¹, Н.В. Шалиго², А.Л. Ольшанікова¹, А.Н. Гриц¹, Т.Б. Макарова¹,
Е.Н. Олещук¹, Е.Н. Карасева¹, Е.Н. Рибінська¹, Е.А. Філіпчик², Т.Г. Каляга²*

¹Інститут експериментальної ботаніки ім. В.Ф. Купревича Національної академії наук Білорусі, Мінськ

²Інститут біофізики та клітинної інженерії Національної академії наук Білорусі, Мінськ

Наведено експериментальні дані, що вказують на опосередкований захист розсади картоплі, вирощуваної на іонообмінному субстраті, до складу якого входить хітозан у концентраціях 1, 5 і 10 г/л. Початково до зараження Х-вірусом досліджувані рослини характеризувались підвищеним рівнем активних форм кисню (АФК) і вищим антиоксидантним статусом (вмістом відновленого аскорбату). Після інфікування захист картоплі від Х-вірусного зараження реалізувався через підвищення вмісту фенольних сполук, активності фенольної пероксидази та рівня експресії гена гіперчутливості. Отримані дані можна використати при захисті вихідного матеріалу картоплі в процесі мікроклонування й отримання міні-бульб у системі первинного насінництва картоплі за іонітопонною технологією.

Ключові слова: безвірусна насіннева картопля, антиоксиданти, стрес, експресія генів стійкості, іонообмінний субстрат, in vivo, оптимізація.

INFLUENCE OF CHITOSAN ON OXIDATIVE STATUS, ENZYMES OF OXIDATIVE METABOLISM AND X-VIRAL INFECTION OF POTATO PLANTS (*SOLANAUM TUBEROSUM* L.) ON ARTIFICIAL ION EXCHANGE SUBSTRATES IN VIVO

T.G. Yanchevskaya¹, N.V. Shalygo², A.L. Olshanikova¹, A.N. Grits¹, T.B. Makarova¹, E.N. Oleshuk¹, E.N. Karaseva¹, E.N. Rybinskaya¹, E.A. Filipchuk², T.G. Kaliha²

¹Kuprevich Institute of Experimental Botany, National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., Minsk, 220072, Belarus
e-mail: t_yanch@mail.ru

²Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus
27 Akademicheskaya St., Minsk, 220072, Belarus

Presented experimental data indicate indirect protection of potato seedlings grown on ion-exchange substrate with chitosan in concentrations of 1, 5 and 10 g/l. Best variant was ion exchange substrate with chitosan content of 5 g/l, which reduced the titer of X-virus of infected potato seedlings in 2.3 times. It is established that the protection of potato from X-viral infection is carried out according to the anti-stress mechanism, involving the generation of reactive oxygen species (ROS), activation of general antioxidant status, increase of antioxidant enzymes activity and expression of hypersensitivity gene. These data can be used to protect the potato source material in the process of micro propagation and receiving of mini-tubers for potatoes seed-growing.

Key words: disease-free seed potatoes, antioxidants, stress, expression of hypersensitivity gene, ion exchange substrate, in vivo, optimization.