

DOI 10.69536/FKR.2025.77.12.001
УДК 632.911.2; 58.084.1; 578.85/.86

DOI 10.69536/FKR.2025.77.12.001
UDC 632.911.2; 58.084.1; 578.85/.86

Растения картофеля в культуре *in vitro* как модель для поддержания и изучения вирусов

*Абрамова А. С.¹, Усков А. И.², Кирюшина А. С.³, Соловьев А. А.⁴, Копкова Т. А.⁵, Калашников А. А.⁶, Гарибян Ц. С.⁷

^{1, 3, 4, 5, 6, 7} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150
² ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» (ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени Лорха»), д. п. Красково, г. Люберцы, Московская обл., Россия, 140051

¹ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

²ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

³ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

⁴ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

⁵ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

⁶ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

⁷ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В данной статье рассматриваются перспективы использования растений картофеля в культуре *in vitro* для поддержания и изучения вирусов, а также представлен краткий обзор информации о рекомендуемом протоколе выращивания и микроклонального размножения вирусных растений картофеля в культуре *in vitro*. Создание коллекции патогенных и карантинных вирусов растений *in vitro* необходимо для разработки исследовательской базы вирусов растений. Многие вирусы плохо сохраняются в мертвом растительном материале в течение длительного времени, поэтому наличие коллекции живых изолированных растений позволит сохранять материал и проводить исследования на протяжении всего года, наблюдать динамику развития симптомов. Наблюдение за симптомами в стерильных и изолированных условиях *in vitro* позволит объективно и более точно охарактеризовать симптомы, вызываемые различными штаммами и видами вирусов. Некоторые растения, в том числе и в культуре *in vitro*, могут служить индикаторами и использоваться для подтверждения наличия инфекции. В данной работе применены методы микроклонального размножения растений, метод ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией, для выявления вирусов в растительном материале, а также методы стерилизации, необходимые для работы с асептичес-

Potato plants *in vitro* culture as a model for maintaining and studying viruses

* Aleksandra S. Abramova¹, Aleksandr I. Uskov², Anastasia S. Kiryushina³, Aleksandr A. Soloviev⁴, Tatiana A. Kopkova⁵, Andrey A. Kalashnikov⁶, Tsovinar S. Garibyan⁷

^{1, 3, 4, 5, 6, 7} All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

² Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow Oblast, Russia, 140051

¹ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

²ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

³ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

⁴ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

⁵ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

⁶ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

⁷ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

ABSTRACT

This article examines the prospects for using potato plants *in vitro* for maintaining and studying viruses, and provides a brief overview of the recommended protocol for growing and micropropagating potato virus plants *in vitro*. The creation of a collection of pathogenic and quarantine plant viruses *in vitro* is essential for developing a plant virus research base. Many viruses do not maintain well in dead plant material for long periods, so a collection of live isolated plants will allow for the preservation of material and year-round research, as well as the monitoring of symptom development dynamics. Observing symptoms under sterile and isolated *in vitro* conditions will allow for an objective and more accurate characterization of the symptoms caused by various virus strains and species. Certain plants, including those cultured *in vitro*, can serve as indicators and be used to confirm infection. This study utilized plant micropropagation methods, PCR

ким растительным материалом. Результаты проведенного исследования доказали эффективность хранения вирусов растений в культуре *in vitro*. Полученные данные методом ОТ-ПЦР-РВ показали сохранение вирусов в ходе микроклонального размножения зараженных вирусами растений в культуре *in vitro* вне зависимости от пассажа. То есть данный метод позволяет хранить живой вирусный материал на протяжении длительного периода времени.

Ключевые слова. *Solanum tuberosum* L, вирусы растений, микроклональное размножение, ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ.

ВВЕДЕНИЕ



Картофель (*Solanum tuberosum* L.) относится к числу наиболее значимых продовольственных и сельскохозяйственных культур, занимая четвертое место в мире по объемам производства, уступая лишь рису, пшенице и кукурузе. (Devaux et al., 2021; Jiang, Du, Zhang, 2022).

Среди большого числа болезней картофеля вирусные являются серьезной глобальной проблемой в картофелеводстве, снижая урожайность картофеля более чем на 50%. Вирусы картофеля X (PVX), Y (PVY), S (PVS) и M (PVM), а также вирус скручивания листьев картофеля (PLRV) являются основными патогенами, снижающими качество и урожайность сельскохозяйственных культур (Григорян, Ткаченко, 2019; Масленникова, Пыхтина, Табанюхов, 2024; Усков и др., 2024; Chung, Yoon, Palukaitis, 2013; Yanagisawa, Matsushita, 2021).

Современные методы борьбы с вирусными инфекциями картофеля осложняются тем, что большинство вирусов не может долго сохраняться в мертвом растительном материале. В этой связи актуальность приобретает разработка и внедрение методов длительного хранения и исследования вирусов в коллекциях живых изолированных растений (Батыгина, Васильева, 2002; Бабикова, Горпенченко, 2007). Применение культуральных систем *in vitro* открывает новые возможности для круглогодичного поддержания материала, мониторинга развития симптомов и популяционной динамики вирусов.

Особое значение имеют наблюдения за проявлением симптоматики вирусных инфекций в стандартизированных стерильных условиях *in vitro*. Использование растений-индикаторов, в том числе в сочетании с морфологическими признаками и молекулярно-генетическими методами, позволяет объективно оценивать проявление поражения, что расширяет возможности идентификации и характеристики различных штаммов и видов вирусов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей культивирования растений картофеля, инфицированных различными вирусами, в системе *in vitro*. В рамках работы решались задачи установления заражения вирусами асептического материала методом обратной транскрипции в сочетании с мультиплексной полимеразной цепной реакцией и

combined with reverse transcription to detect viruses in plant material, and sterilization methods necessary for working with aseptic plant material. The results of the study demonstrated the effectiveness of preserving plant viruses *in vitro*. The data obtained using the real-time RT-PCR method demonstrated the persistence of viruses during microclonal propagation of virus-infected plants *in vitro*, regardless of the passage. This method allows for the storage of live viral material over an extended period of time.

Key words. *Solanum tuberosum* L, plant viruses, microclonal propagation, PCR, real-time RT-PCR.

INTRODUCTION



Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food and agricultural crops, ranking fourth in the world in terms of production volume, second only to rice, wheat and corn (Devaux et al., 2021; Jiang,

Du, Zhang, 2022).

Among the large number of potato diseases, viral diseases are a serious global problem in potato production, reducing potato yields by more than 50%. Potato viruses X (PVX), Y (PVY), S (PVS) and M (PVM), as well as potato leafroll virus (PLRV) are the main pathogens that reduce the quality and yield of agricultural crops (Grigoryan, Tkachenko, 2019; Maslennikova, Pykhtina, Tabanyukhov, 2024; Uskov et al., 2024; Chung, Yoon, Palukaitis, 2013; Yanagisawa, Matsushita, 2021).

Current methods for controlling potato viral infections are complicated by the fact that most viruses cannot persist for long in dead plant material. Therefore, the development and implementation of methods for long-term storage and study of viruses in collections of living isolated plants is becoming increasingly important (Batygina, Vasilyeva, 2002; Babikova, Gorpenchenko, 2007). The use of *in vitro* culture systems opens up new opportunities for year-round material maintenance, monitoring of symptom development, and virus population dynamics.

Monitoring the manifestation of viral infection symptoms under standardized, sterile *in vitro* conditions is particularly important. The use of indicator plants, including in combination with morphological characteristics and molecular genetic methods, allows for an objective assessment of the manifestations of infection, expanding the possibilities for identifying and characterizing various virus strains and species.

The aim of this study was to investigate the *in vitro* cultivation of potato plants infected with various viruses. This work addressed the problem of detecting viral infection of aseptic material using reverse transcription, multiplex polymerase chain

Табл. 1. Перечень растений картофеля, зараженных вирусами в культуре *in vitro*
Table 1. List of potato plants infected with viruses *in vitro*

Образец растений картофеля Potato sample	Наличие вируса Virus present
Osa Osa	PLRV
24 24	PVM
Загадка Zagadka	PVY
Красавчик Krasavchik	PVX
Лисана Lisana	PVS

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись растения картофеля различных сортов, зараженные вирусами в культуре *in vitro* (см. табл. 1).

Одним из ключевых факторов успешного культивирования зараженных вирусами растений картофеля *in vitro* является строгий контроль стерильности в отношении других патогенов. Тщательная стерилизация необходима для предотвращения контаминации и развития посторонних патогенных микроорганизмов на искусственных питательных средах, предназначенных для выращивания инфицированных растений. Все работы с зараженными вирусами растениями *in vitro* проводили в ламинарных боксах, обеспечивающих стерильные условия. Перед началом экспериментов и в ходе работы подвергали стерилизации не только рабочее пространство бокса, но и инструменты, лабораторную посуду, питательные среды и прочие расходные материалы в соответствии с методическими рекомендациями (Калашникова, 1998).

Стерилизацию стеклянной посуды и металлических инструментов осуществляли в сухожаровом шкафу при температуре +175 °C в течение двух часов либо автоклавированием. Автоклавированию подвергали пробирки, колбы с дистиллированной водой и питательными средами, которые обрабатывали при температуре 121 °C и давлении 1,2 атм в течение 20 минут (Калашникова, 1998).

Зараженные вирусами растения картофеля культивировали на универсальной безгормональной питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), используя метод микроклонального размножения. Для поддержания стерильных условий внутренние поверхности ламинар-бокса протирали 5%-м раствором дезинфицирующего средства «Дезитабс», содержащего натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты, а также облучали бактерицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 10–12 часов. После УФ-облучения включали свет и обеспечивали вентиляцию (Калашникова, 1998).

Перед началом работ руки протирали 70%-м этанолом. Внутри ламинар-бокса в стерильные стеклянные пробирки разливали растопленную агаризованную питательную среду МС (температура среды (60 ± 5) °C) по 30 мл в каждую. Пробирки с растениями, пригодными для черенкования, обрабатывали 96%-м спиртом, после чего поме-

reaction, and real-time fluorescence hybridization detection (real-time RT-PCR).

MATERIALS AND METHODS

The objects of the study were potato plants of different varieties infected with viruses *in vitro* culture (Table 1).

One of the key factors for the successful *in vitro* cultivation of virus-infected potato plants is strict sterility control with respect to other pathogens. Thorough sterilization is necessary to prevent contamination and the development of foreign pathogens in artificial nutrient media intended for growing infected plants. All work with virus-infected plants *in vitro* was carried out in laminar flow hoods ensuring sterile conditions. Before and during experiments, not only the hood workspace but also the instruments, laboratory glassware, nutrient media, and other consumables were sterilized in accordance with methodological recommendations (Kalashnikova, 1998).

Glassware and metal instruments were sterilized in a dry-heat oven at 175°C for 2 hours or by autoclaving. Test tubes and flasks containing distilled water and nutrient media were autoclaved at 121°C and 1.2 atm for 20 minutes (Kalashnikova, 1998).

Virus-infected potato plants were grown on a universal, hormone-free Murashige-Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog, 1962) using micropropagation. To maintain sterile conditions, the interior surfaces of the laminar flow cabinet were wiped with a 5% solution of Desitabs disinfectant containing sodium dichloroisocyanurate and irradiated with bactericidal ultraviolet lamps for 10–12 hours. After UV irradiation, the lights were turned on and ventilation was provided (Kalashnikova, 1998).

Before starting work, hands were wiped with 70% ethanol. Inside a laminar flow hood, melted MS agar nutrient medium (temperature 60 ± 5 °C) was poured into sterile glass test tubes, 30 ml each. The tubes containing plants suitable for cuttings were treated with 96% alcohol and then placed in the laminar flow hood. Using sterile tweezers, the plants were carefully removed from the tubes and placed on the prepared surface for cuttings. Using a sterile scalpel, the plant was divided so that each part contained a stem segment with a leaf and an axillary bud. The resulting cuttings were transplanted into test tubes containing MS nutrient medium,

щали в ламинарный бокс. Стерильным пинцетом растения аккуратно извлекали из пробирок и размещали для черенкования на подготовленную поверхность. Используя стерильный скальпель, делили растение так, чтобы каждая часть содержала отрезок стебля с листом и пазушной почкой. Образовавшиеся черенки пересаживали в пробирки с питательной средой МС, погружая их на глубину междоузлия (Ескендинова и др., 2013). Интервал между последовательными черенкованиями составлял 20–25 дней.

Для исключения перекрестного заражения использовали индивидуальные комплекты инструментов для каждого образца растения. Все инструменты в процессе работы регулярно дезинфицировали, прокаливая в пламени спиртовки (Бабикова, Горпенченко, 2007).

После черенкования пробирки размещали на фитостеллажах в световой камере с освещенностью 3000 люкс, температурой $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ и световым режимом 16 часов в сутки. Корнеобразование у черенков отмечали уже на третий день. Для массового размножения растений картофеля микрклональное размножение осуществляли с интервалом 20–25 дней. Безвирусные растения с пятью–шестью узлами периодически пересаживали в свежие питательные среды, что обеспечивало непрерывное получение новых пробирочных растений (Ескендинова и др., 2013).

Для получения растительных экстрактов 0,4 г материала гомогенизировали в 6 мл экстрагирующего буфера, состоящего из фосфатно-солевого буфера с детергентом (PBST) с добавлением 2%-го поливинилпирролидона (PVP) и 0,2%-го бычьего сывороточного альбумина (BSA). Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием коммерческого набора компании «Агродиагностика».

Далее выделенные нуклеиновые кислоты использовали для выявления вирусов картофеля с помощью коммерческих наборов реагентов компании «Синтол», предназначенных для дифференциальной диагностики РНК исследуемых вирусов методом обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

ОТ-ПЦР-РВ выполняли на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Детекцию флуоресценции проводили на стадии элонгации с использованием каналов FAM, ROX и HEX. Для анализа конечных результатов применяли программное обеспечение LightCycler® 96, версия SW1.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание растений картофеля, инфицированных вирусами и свободных от других патогенных микроорганизмов, осуществляли на универсальной безгормональной питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) в культуре *in vitro* посредством регулярного микрочеренкования с интервалом 20–25 дней (см. табл. 2). После микрочеренкования зараженные вирусами растения пересаживали в пробирки со свежей питательной средой МС (см. рис. 1, а). К 14-му дню после черенкования рост растений достигал 10–15 см (см. рис. 1, б).

Следует отметить, что в течение более полутора растений трех пассажей не имели морфологи-

immersing them to the depth of an internode (Eskendirova et al., 2013). The interval between successive cuttings was 20–25 days.

To prevent cross-contamination, individual sets of instruments were used for each plant specimen. All instruments were regularly disinfected during the work process by heating them in a spirit lamp (Babikova, Gorpenchenko, 2007).

After propagation by cuttings, the test tubes were placed on phytoracks in a light chamber with 3000 lux illumination, a temperature of $22^\circ\text{C} (\pm 2^\circ\text{C})$, and a light regime of 16 hours per day. Rooting of the cuttings was observed as early as the third day. For mass propagation of potato plants, micropropagation was carried out at intervals of 20–25 days. Virus-free plants with 5–6 nodes were periodically transplanted into fresh nutrient media, which ensured the continuous production of new test tube plants (Eskendirova et al., 2013).

To obtain plant extracts, 0.4 g of material was homogenized in 6 ml of extraction buffer consisting of phosphate-buffered saline with Tween (PBST) supplemented with 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0.2% bovine serum albumin (BSA). Nucleic acids were isolated using an Agrodiagnostika commercial kit.

The isolated nucleic acids were then used to detect potato viruses using Synthol commercial reagent kits designed for differential diagnostics of RNA of the viruses under study using the method of reverse transcription with polymerase chain reaction in real time (real-time RT-PCR).

Real-time RT-PCR was performed on a CFX96 Touch instrument (Bio-Rad, USA). Fluorescence detection was performed during the elongation phase using the FAM, ROX, and HEX channels. LightCycler® 96 software, version SW1.1, was used for final results analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Potato plants infected with viruses and free of other pathogens were grown *in vitro* on a universal hormone-free Murashige-Skoog (MS) nutrient medium by regular microcutting at intervals of 20–25 days (Table 2). After microcutting, virus-infected plants were transplanted into test tubes with fresh MS nutrient medium (Fig. 1a). By the 14th day after cutting, plant growth reached 10–15 cm (Fig. 1b).

It should be noted that for more than six months, plants from the three passages showed no morphological differences between passages. However, varietal differentiation was noted in the number of nodes per plant, which explains the differences in cuttings between the variants.

The plants obtained as a result of *in vitro* propagation were analyzed for the presence of the studied viruses—PVX, PVY, PLRV, PVM, and PVS. Leaves and microtubers (if available) of plants of each variety and passage were selected for analysis (Table 3).

In the study, 25 samples were analyzed using real-time RT-PCR, including 5 contamination controls (negative controls) and 5 positive controls from commercial diagnostic kits. Amplification of the controls was detected in all samples, indicating the absence of an inhibitory effect and confirming the

Табл. 2. Пассажи пробирочных растений картофеля, зараженных разными вирусами
Table 2. Passages of test-tube potato plants infected with different viruses

Вирусы Viruses	Число пробирочных растений картофеля в ходе пассажей, шт. Number of test-tube potato plants during passages, pcs.			Всего Total
	1-й пассаж 1 passage	2-й пассаж 2 passage	3-й пассаж 3 passage	
PVX	6	15	24	45
PVY	14	20	27	61
PLRV	10	21	36	67
PVM	10	23	35	68
PVS	6	17	25	48

Табл. 3. Список исследуемых образцов растений картофеля *in vitro*, зараженных вирусами, используемых для ПЦР-анализа

Table 3. List of *in vitro* potato plant samples infected with viruses used for PCR analysis

№ образца Sample №	Сорт картофеля Potato variety	Вирус Virus	Материал Material	№ пассажа Passage №
1	Osa Osa	PLRV	листья leaves	3
2	Osa Osa	PLRV	клубни tubers	1
3	Osa Osa	PLRV	листья leaves	1
4	24 24	PVM	листья leaves	3
5	24 24	PVM	клубни tubers	1
6	24 24	PVM	листья leaves	1
7	Загядка Zagadka	PVY	листья leaves	1
8	Загядка Zagadka	PVY	клубни tubers	1
9	Загядка Zagadka	PVY	листья leaves	3
10	Красавчик Krasavchik	PVX	листья leaves	3
11	Красавчик Krasavchik	PVX	клубни tubers	3
12	Красавчик Krasavchik	PVX	листья leaves	1
13	Лисана Lisana	PVS	листья leaves	3
14	Лисана Lisana	PVS	клубни tubers	1
15	Лисана Lisana	PVS	листья leaves	1

ческих различий между пассажами. При этом отмечена сортовая дифференциация по числу узлов на растении, чем обусловлено различие черенкованных растений между вариантами.

Полученные в результате размножения *in vitro* растения подвергали анализу на присутствие в них изучаемых вирусов – PVX, PVY, PLRV, PVM и PVS. Для анализа отбирали листья и микроклубни (при наличии) растений каждого сорта и пассажа (см. табл. 3).

В исследовании методом ОТ-ПЦР-PB проанализировано 25 образцов, включая пять контролей контаминации (отрицательный контроль) и пять положительных контролей из коммерческих диагностических наборов. Амплификация контролей была зафиксирована во всех образцах, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего воздействия и подтверждает корректность полученных данных. Положительные контроли продемонстрировали ожидаемые пороговые циклы (C_q).

Результаты ОТ-ПЦР-PB, представленные в табл. 4, подтверждают присутствие исследуемых вирусов во всех анализируемых растениях, что

accuracy of the obtained data. Positive controls demonstrated the expected threshold cycles (C_q).

The results of real-time RT-PCR presented in Table 4 confirm the presence of the studied viruses in all analyzed plants, which indicates the success of microclonal propagation and the preservation of viral material throughout the cutting procedure.

CONCLUSION

The study demonstrated the high effectiveness of *in vitro* culture as a tool for maintaining and studying potato plant viruses. Regular microcutting of plants infected with PVX, PVY, PLRV, PVM, and PVS viruses allows for the maintenance of both the viability of the plants themselves and the viability and stability of the viral material over a long period.

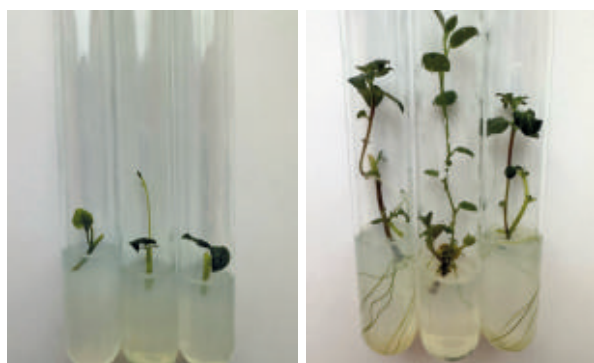


Рис. 1. а – черенки растений картофеля, зараженные вирусом PVX, сорта Красавчик сразу после черенкования; б – черенки растений картофеля, зараженные вирусом PVX, сорта Красавчик спустя 14 дней после черенкования

свидетельствует об успешности микроклонального размножения и сохранении вирусного материала на протяжении процедуры черенкования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования доказана высокая эффективность культуры *in vitro* как инструмента для поддержания и изучения вирусов растений картофеля. Регулярное микрочеренкование растений, зараженных вирусами PVX, PVY, PLRV, PVM и PVS, позволяет сохранять как сами растения в жизнеспособном состоянии, так и жизнеспособность и стабильность вирусного материала на протяжении длительного времени.

Молекулярно-генетический анализ методом ОТ-ПЦР-РВ подтвердил устойчивое присутствие исследуемых вирусов в растительном материале на разных этапах микрочеренкования, что свидетельствует о надежности выбранной методики.

Полученные данные позволяют заключить, что микроклональное размножение *in vitro* обеспечивает сохранность вирусов и растений, в которых они размножаются, что дает возможность создания стандартизированной коллекции растений с вирусной моноинфекцией для их долговременного хранения и дальнейшего исследования.

Полученные результаты могут служить основой для разработки новых протоколов хранения вирусных коллекций и внедрения современных диагностических технологий в лабораторную практику.

Исследования выполнены в рамках государственного задания «Разработка методов введения и поддержания вирусов в культуре *in vitro*» (регистрационный номер НИОКТР 125040304814-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабилова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. 2007. LV. С. 184–211.
2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002, 232 с.
3. Григорян М.А., Ткаченко О.В. Получение оздоровленного картофеля и диагностика вирусных заболеваний в условиях Энгельсского района

Molecular genetic analysis using the real-time RT-PCR method confirmed the stable presence of the studied viruses in plant material at different stages of micro-cutting, which indicates the reliability of the chosen method.

The obtained data allow us to conclude that *in vitro* microclonal propagation ensures the preservation of viruses and the plants in which they reproduce, which makes it possible to create a standardized collection of plants with viral monoinfection for their long-term storage and further research.

The obtained results can serve as a basis for the development of new protocols for storing viral collections and the introduction of modern diagnostic technologies into laboratory practice.

The research was carried out within the framework of the state assignment “Development of methods for introducing and maintaining viruses *in vitro* culture” (registration number NIOKTR 125040304814-8)).

REFERENCES

1. Babikova A.V., Gorpenchenko T.Yu., Zhuravlev Yu.N. Plant as an object of biotechnology [Rasteniye kak obyekt biotekhnologii] // Komarov readings. 2007. LV. P. 184–211. (In Russ.)
2. Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Plant propagation. [Razmnozhenie rasteniy] SPb.: Publishing house St. Petersburg. Univ., 2002, 232 pp. (In Russ.)
3. Grigoryan M.A., Tkachenko O.V. Obtaining healthy potatoes and diagnostics of viral diseases in the Engels district of Saratov Oblast [Polucheniye ozdorovlennogo kartofelya i diagnostika virusnykh zabolevaniy v usloviyakh Engelsskogo rayona Saratovskoy oblasti] // Agrarian science. 2019; 3: 60–63. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63> (In Russ.)
4. Eskandirova S. Z. et al. Isolation, purification and immunochemical characterization of potato virus preparations [Vydeleniye, ochistka i immunokhimicheskaya kharakteristika virusnykh preparatov kartofelya] // Biotechnology. Theory and Practice. 2013; 4: 63–67. <https://doi.org/10.11134/btp.4.2013.10> (In Russ.)
5. Kalashnikova B.A. Clonal micropropagation of plants [Klonalnoye mikrorazmnozheniye rasteniy] // Agricultural biotechnology: Ed. by V.S. Shevelukha. Moscow: Higherschool, 1998. 36–66 p. (In Russ.)
6. Maslennikova V. S., Pykhtina M. B., Tabanyukhov K. A. Prevalence and species composition of potato viruses in Novosibirsk Oblast [Rasprostranennost i vidovoy sostav virusov kartofelya v Novosibirskoy oblasti] // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024; 28 (5):554–562. <https://doi.org/10.18699/vjgb-24-61> (In Russ.)
7. Uskov A. I. et al. Serological and phytopathological characteristics of potato Y-virus isolates distributed in various regions of the Russian Federation [Serologicheskaya i fitopatologicheskaya kharakteristika izolyatov Y-virusa kartofelya, rasprostranennykh na territorii razlichnykh regionov Rossiyskoy Federatsii] // Scientific works on agronomy. 2024; 4 (15): 26–34. (In Russ.)

Табл. 4. Результаты ОТ-ПЦР-РВ образцов растений картофеля *in vitro*, зараженных вирусами, по двум каналам флуоресценции
Table 4. Results of real-time RT-PCR of potato plant samples *in vitro* infected with viruses, using two fluorescence channels

№ образца Sample №	Сорт картофеля Potato variety	Вирус Virus	№ пассажа Passage №	Значение C _q C _q
1	Osa Osa	PLRV	3	22,27
2	Osa Osa	PLRV	1	18,39
3	Osa Osa	PLRV	1	18,32
Положительный контроль Positive control		PLRV	-	35,17
Отрицательный контроль Negative control		PLRV	-	0,00
4	24	PVM	3	19,02
5	24	PVM	1	21,16
6	24	PVM	1	22,48
Положительный контроль Positive control		PVM	-	34,87
Отрицательный контроль Negative control		PVM	-	0,00
7	Загадка Zagadka	PVY	1	21,54
8	Загадка Zagadka	PVY	1	24,73
9	Загадка Zagadka	PVY	3	20,08
Положительный контроль Positive control		PVY	-	28,84
Отрицательный контроль Negative control		PVY	-	0,00
10	Красавчик Krasavchik	PVX	3	21,85
11	Красавчик Krasavchik	PVX	3	22,89
12	Красавчик Krasavchik	PVX	1	20,14
Положительный контроль Positive control		PVX	-	26,77
Отрицательный контроль Negative control		PVX	-	0,00
13	Лисана Lisana	PVS	3	15,85
14	Лисана Lisana	PVS	1	17,82
15	Лисана Lisana	PVS	1	14,72
Положительный контроль Positive control		PVS	-	28,51
Отрицательный контроль Negative control		PVS	-	0,00

Саратовской области // Аграрная наука. 2019. № 3. С. 60–63. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63>.

4. Ескендирова С. З. и др. Выделение, очистка и иммунохимическая характеристика вирусных препаратов картофеля // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 4, С. 63–67. <https://doi.org/10.11134/btp.4.2013.10>.

5. Калашникова Б. А. Клональное микроразмножение растений // Сельскохозяйственная биотехнология: Под ред. В. С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 1998. С. 36–66.

6. Масленникова В. С., Пыхтина М. Б., Табанюхов К. А. Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024. № 28 (5). С. 554–562. <https://doi.org/10.18699/vjgb-24-61>.

8. Chung, B.N., Yoon, J.Y., Palukaitis, P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y // Virus Genes. 2013. Vol. 47. P. 86–92. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0904-4>

9. Devaux, A., Goffart, J.P., Kromann, P., Andrade, P.J., Polar, V., Hareau, G. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-food Systems // Potato Res. 2021. Vol. 64. P. 681–720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>

7. Усков А. И. и др. Серологическая и фитопатологическая характеристика изолятов Y-вируса картофеля, распространенных на территории различных регионов Российской Федерации // Научные труды по агрономии. 2024. № 4 (15). С. 26–34.

8. Chung, B.N., Yoon, J.Y., Palukaitis, P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y // Virus Genes. 2013. Vol. 47. P. 86–92. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0904-4>.

9. Devaux, A., Goffart, J.P., Kromann, P., Andrade, P.J., Polar, V., Hareau, G. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-food Systems // Potato Res. 2021. Vol. 64. P. 681–720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Абрамова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник, аспирант, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

Усков Александр Иринархович, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий отделом биотехнологии и иммунодиагностики, ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени Лорха», г. Люберцы, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

Соловьев Александр Александрович, заместитель директора, доктор биологических наук, профессор РАН, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

Кирюшина Анастасия Святославовна, младший научный сотрудник, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

Копкова Татьяна Анатольевна, научный сотрудник, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ученый секретарь, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

Калашников Андрей Алексеевич, младший научный сотрудник, аспирант, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

Гарибян Цовинар Саркисовна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

10. Jiang L., Du Z., Zhang G. Advances in RNA-Silencing-Related Resistance against Viruses in Potato // Genes. 2022. Vol. 13(5). P. 731. <https://doi.org/10.3390/genes13050731>

11. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

12. Yanagisawa H., Matsushita Y. Occurrence and distribution of viruses infecting potato in Russia // Letters in Applied Microbiology. 2021. Vol. 73. P. 64 – 72. <https://doi.org/10.1111/lam.13476>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandra Abramova, Junior Researcher, Postgraduate student, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

Aleksandr Uskov, Advanced Doctor of Agriculture, Head of the Department of Biotechnology and Immunodiagnosics, Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Lyubertsy, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

Aleksandr Soloviev, Deputy Director, Advanced Doctor of Biology, Professor of the Russian Academy of Sciences, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

Anastasia Kiryushina, Junior Researcher, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

Tatiana Kopkova, Researcher, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

Andrey Kalashnikov, Junior Researcher, Postgraduate student, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

Tsovinar Garibyan, Phd Technical Sciences, Senior Researcher, Head of Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru