

ОЗДОРОВЛЕНИЕ СОРТОВ ВИШНИ (*PRUNUS CERASUS* L.) И СЛИВЫ (*PRUNUS DOMESTICA* L.) ОТ ВИРУСОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОМ

Л.А. ЛУКИЧЕВА, кандидат биологических наук;
О.В. МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук;
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Одним из сдерживающих факторов развития современного садоводства является поражение плодовых культур вирусной инфекцией [5, 13]. В комплексе мероприятий по борьбе с вирусными болезнями, наряду с приемами ранней и точной диагностики, позволяющими оценить состояние растения, своевременно выявить и выбраковать пораженные, отобрать здоровые маточные экземпляры, важное место занимают биотехнологические приемы оздоровления и получения безвирусного посадочного материала. Результаты визуального обследования и экспериментальной проверки на выявление вирусных болезней в Крыму и ряде других регионов Украины в последние годы показали высокий уровень зараженности ценных промышленных и новых перспективных сортов косточковых плодовых культур вирусами [1, 14, 16]. Наиболее распространенными и вредоносными среди вирусов косточковых плодовых культур, в том числе вишни и сливы, являются вирусы некротической кольцевой пятнистости (*Prunus necrotic ringspot virus* - PNRSV), карликовости сливы (*Prune dwarf virus* - PDV) и шарки сливы (*Plum pox potyvirus* - PPV) [14, 15].

В связи с этим, целью исследований была разработка биотехнологических приемов оздоровления растений вишни и сливы, пораженных вирусной инфекцией.

Материалы и методы

Работа выполнена в отделе биотехнологии Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ). Объектами исследования служили пораженные вирусами растения сортов вишни (*Prunus cerasus* L.): Эрди Ботермо, Подбельская, Чернокорка, Короска и сливы (*Prunus domestica* L.): Стенлей, Гвардейская Синяя, Персиковая, Венгерка Юбилейная.

В экспериментальной работе использовали как общепринятые методы вирусологических и биотехнологических исследований [2, 4, 12, 13], так и разработанные или модифицированные нами применительно к конкретной цели и задачам опытов. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки и верхушки активно растущих побегов вишни и сливы, отобранные с предварительно протестированных на вирусы растений.

Тестирование и ретестирование на вирусы исходного и оздоровленного посадочного материала выполняли по общепринятым модельным схемам с использованием стандартного набора растений-индикаторов [5, 13, 22], и серологически (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay) [3, 20, 23]. При выявлении состава вирусов в пораженных деревьях вишни и сливы использовали травянистые: *Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. foetidum* Schrad., *Cucumis sativus* L. 'Delikatess', *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L. и древесные: *Prunus serrulata* Lindl. 'Shirofugen' растения-индикаторы. Для повышения эффективности механической передачи вирусной инфекции на травянистые растения-индикаторы инокулюм готовили в 0,1М фосфатном буфере Серенсена pH 7,0 с вирусстабилизирующими добавками (0,2% сульфит натрия, 0,2% аскорбиновая кислота, 0,01М диэтилдитиокарбамат натрия, 1% кофеин); в 0,01М буфере Трис/HCl pH 8,5 (0,005М MgSO₄, 0,1% Na₂SO₃, 0,1% аскорбиновая кислота, 1% кофеин) и в 0,1М боратном буфере pH 8,0. В качестве инокулюма использовали лепестки цветков, почки и листья. Растения огурцов (*Cucumis sativus* 'Delikatess') и тыквы (*Cucurbita maxima* 'Melone') инфицировали в фазе семядольных листьев. На древесном индикаторе *Prunus serrulata* 'Shirofugen' применяли массированную инокуляцию индикатора способом окулировки 4-8 почками (глазками) с испытуемого образца.

В качестве основных методов исследований при разработке биотехнологических приемов оздоровления сортов вишни и сливы от вирусов использовали культуру органов и тканей, термотерапию и хемотерапию [6-8, 11, 13, 20]. Базовой средой была агаризованная среда МС (Murashige, Skoog, 1962) [21], на основе которой были разработаны 3 состава сред (МС-1, МС-2, МС-3) для определенного этапа морфогенеза. В качестве индуктора образования адвентивных почек и микропобегов использовали 6-бензиламинопури (БАП) в концентрации от 1,11 до 6,66 мкМ.

Оздоровление растений от вирусной инфекции проводили сочетанием методов культуры органов и тканей и термотерапии *in vitro* или культуры органов и тканей и хемотерапии *in vitro*. При термотерапии *in vitro* культуральные сосуды с микропобегами и регенерантами помещали в термокамеру. В термокамере обеспечивали 16-часовой фотопериод с температурой 27-37 °С и интенсивностью освещения 2,5 клк. Экспозиция термотерапии составляла от 10 до 40 суток. Хемотерапию проводили с использованием ингибиторов вирусов – вироцидов: виразола (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) в концентрациях 1-50 мг/л и НЕО-ДНТ (2,4-диоксогексагидро-1,3,5-триазин) в концентрациях 50-100 мг/л путём непосредственного введения их в питательные среды.

Результаты и обсуждение

Высокая степень поражения сортов вишни и сливы прежде всего вызвала необходимость идентификации наиболее распространенных и вредоносных вирусов. В результате тестирования 4 сортов вишни и 4 сортов сливы удалось выявить 7 вирусов, из которых наиболее вредоносными являются Prune dwarf virus (PDV), Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) и Plum pox potyvirus (PPV). Учитывая это, для оздоровления пораженных сортов в систему оздоровления были включены методы культуры органов и тканей, термотерапии и хемотерапии *in vitro*.

Культивируемые *in vitro* экспланты вишни сортов Чернокорка, Подбельская, Эрди Ботермо, Короска и сливы сортов Персиковая, Стенлей, Венгерка Юбилейная, Гвардейская Синяя были поражены вирусами карликовости сливы (PDV) и некротической кольцевой пятнистости косточковых культур (PNRSV). Достоверность наличия этих вирусных инфекций подтверждена методами тестирования на травянистых (*Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. foetidum* Schrad., *Cucumis sativus* L. 'Delikatess', *Gomphrena globosa* L., *Nicotiana clevelandii* Gray, *N. glutinosa* L.) и древесных (*P. serrulata* Lindl. 'Shirofugen') растениях-индикаторах, наряду с этим вирус шарки (PPV) был обнаружен методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Определены сроки введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*: вегетативные почки – февраль-март; верхушки активно растущих побегов – июнь. Определенные трудности вызвало получение асептической культуры первичных эксплантов. Разработанные в отделе биотехнологии и вирусологии растений НБС-НИЦ режимы ступенчатой стерилизации для вегетативных почек оказались более эффективными [12]. Для активно растущих верхушек побегов положительные результаты получены при стерилизации в растворах 70%-ного этанола в течение 1 мин, 2,2%-ного Domestos в течение 6-8 мин с последующей 4-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой.

На основе базовой питательной среды МС разработаны три модификации питательных сред МС-1, МС-2 и МС-3 с учетом особенностей морфогенеза вишни и сливы. При введении в культуру *in vitro* первичных эксплантов более активное развитие наблюдали на питательной среде МС-1, дополненной БАП в концентрации 2,22 мкМ, ИМК – 1,23 мкМ, тиамином – 7,4 мкМ, мезоинозитом - 555,1 мкМ, и аскорбиновой кислотой – 208 мкМ. На 7-9 сутки культивирования отмечено начало развития эксплантов у вишни сорта Эрди Ботермо. Для индукции образования адвентивных почек и микропобегов лучшей была питательная среда МС-2, в которой в качестве индуктора использовали БАП в концентрации 2,22 мкМ для генотипов вишни и 6,66 мкМ для

генотипов сливы. Коэффициент размножения микропобегов увеличивался и достигал максимальной величины в пятом пассаже. Так, у вишни сорта Эрди Ботермо он был выше и составил в среднем 1:13, у сорта сливы Стенлей – 1:15. Нормально развитые микропобеги вишни и сливы укореняли на питательной среде МС-3, которая содержала $\frac{1}{2}$ состава макро- и микросолей по прописи МС и различные концентрации и соотношения веществ ауксинового типа действия. Оптимальной для укоренения была питательная среда МС-3, дополненная ИМК в концентрации 19,6 мкМ. Ризогенез у генотипов вишни отмечен на 20 сутки культивирования с образованием в среднем 1-2 корня/микропобег, в то время как у сливы – на 28 сутки с образованием 2-3-х корней/микропобег. При этом в процессе эксперимента установлено, что ризогенез был успешным в том случае, когда длина микропобегов была не менее 2 см. Процент укорененных микропобегов составил, в среднем, у сортов вишни $65,0 \pm 2,4\%$, сливы – $61,0 \pm 2,8\%$.

При термотерапии в условиях *in vitro* использовали микропобеги и регенеранты 4 сортов вишни и 4 сортов сливы. Показано, что недельная преадаптация является необходимым условием прохождения термотерапии, что повышает жизнеспособность эксплантов (вначале их выдерживали при температуре 27 °С, и затем её постепенно повышали на 2 °С, доводя до 37 ± 1 °С). Установлено, что термотерапию вишни и сливы *in vitro* следует проводить при температуре 37 ± 1 °С, понижая ее в ночное время на 10 °С для лучшей жизнеспособности растений, что согласуется с литературными данными [8, 19]. Как показали наши исследования, экспозиция термотерапии в условиях *in vitro* составляет 20-40 суток в зависимости от термостойкости вируса, термотолерантности культуры, типа экспланта, генотипа донорного растения.

Доказано, что один и тот же вирус в разных растениях-хозяевах может неодинаково реагировать на изменение температуры [17]. При одном и том же режиме термотерапии выявлено различие в продолжительности оздоровления вишни и сливы. Результаты ретестирования показали оздоровление вишни от вируса некротической кольцевой пятнистости (PNRSV) на 100% при экспозиции термотерапии 20 суток и оздоровление от вируса карликовости (PDV) на 100% при экспозиции 40 суток. Несмотря на увеличение продолжительности термотерапии сливы, пораженной вирусом карликовости (PDV) до 40 суток, удалось оздоровить лишь 70% регенерантов (табл. 1).

Исследованиями показано, что для оздоровления сортов вишни и сливы с применением метода термотерапии *in vitro* целесообразно использовать регенеранты, так как микропобеги не выдерживают данный режим и погибают. Установлена зависимость жизнеспособности регенерантов от экспозиции термотерапии (табл. 2) и генотипа исходного растения. Так, среди сортов вишни более жизнеспособными оказались сорта Эрди Ботермо (90,9%) и Коросска (71,4%), а среди сортов сливы – Стенлей (66,7%) и Гвардейская Синяя (57,1%) (рис. 1, 2). Регенеранты сортов Чернокорка, Подбельская и сливы сортов Персиковая и Венгерка Юбилейная постепенно замедляли рост и формировали укороченные междоузлия. При этом отмечали изменение окраски листьев (хлороз) и их опадение, особенно это было выражено у сортов сливы.

Таблица 1
Результаты термотерапии *in vitro* вишни сорта Подбельская и сливы сорта Персиковая

Вирусы	Количество безвирусных растений / общее количество тестируемых растений (%) при различных экспозициях термотерапии			
	Контроль	20 сут	30 сут	40 сут
Подбельская				
PNRSV	0/21 (0)	19/19 (100)	14/14 (100)	10/10 (100)
PDV	0/21 (0)	8/19 (42,1)	9/14 (69,3)	10/10 (100)
Персиковая				
PNRSV	0/21 (0)	10/16 (62,5)	14/14 (100)	10/10 (100)
PDV	0/21 (0)	3/16 (18,7)	6/14(42,9)	7/10 (70)

Таблица 2

Жизнеспособность микроробегов и регенерантов вишни и сливы в зависимости от экспозиции термотерапии в условиях *in vitro*

Генотип	Жизнеспособность при различных экспозициях термотерапии, %							
	микроробегов				регенеранты			
	10 сут	20 сут	30 сут	40 сут	10 сут	20 сут	30 сут	40 сут
Вишня								
Эрди Ботермо	95,2	80,9	42,9	4,7	100	85,7	85,7	80,9
Коросска	95,2	76,2	28,6	0	100	85,7	80,9	71,4
Подбельская	85,7	66,7	9,5	0	95,2	90,5	66,7	47,6
Чернокорка	80,9	47,6	4,7	0	90,5	71,4	57,1	38,1
Слива								
Стенлей	95,2	57,1	14,3	0	95,2	85,7	85,7	66,7
Гвардейская Синяя	95,2	47,6	4,7	0	95,2	76,2	57,1	57,1
Персиковая	80,9	38,1	0	0	95,2	76,2	66,7	47,6
Венгерка	71,4	23,8	0	0	90,5	80,9	47,6	33,3
Юбилейная								

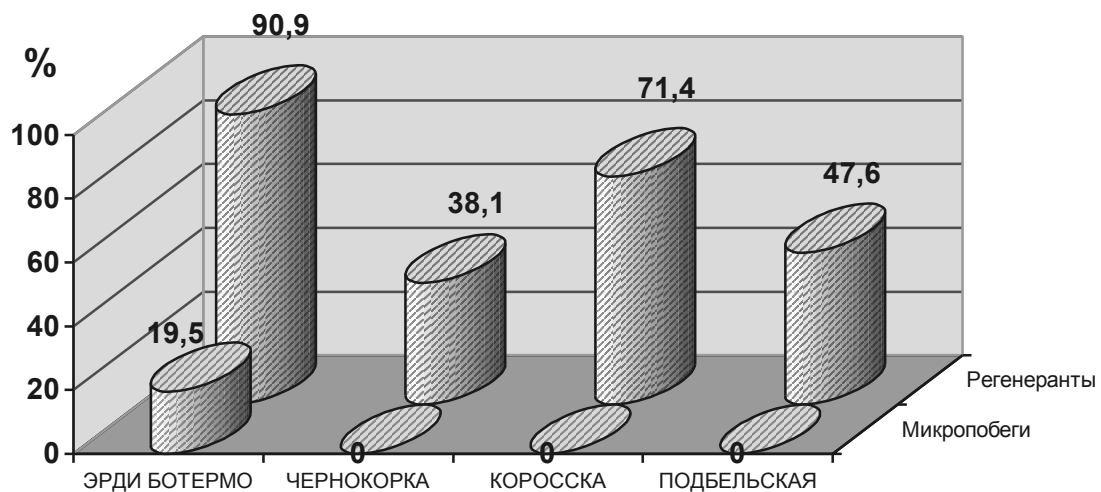


Рис. 1. Жизнеспособность (%) микроробегов и регенерантов сортов *P. cerasus* через 40 суток термотерапии

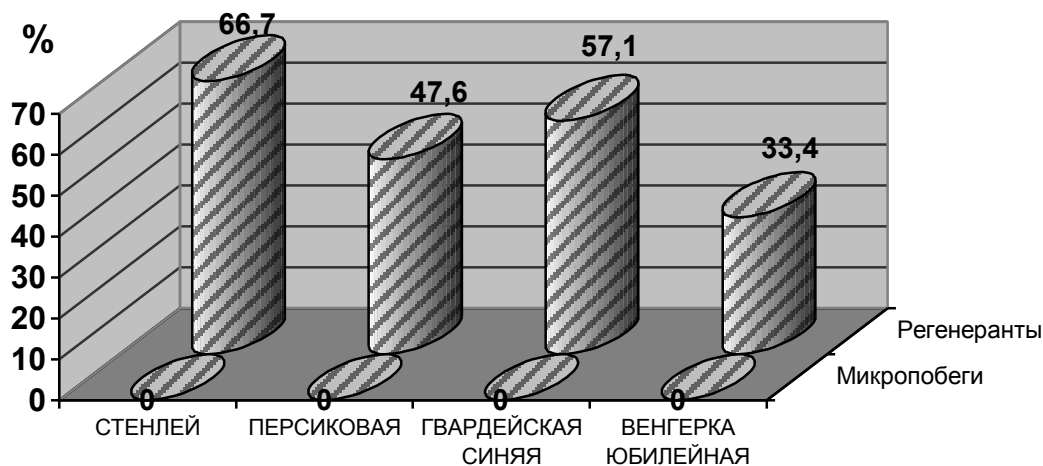


Рис. 2. Жизнеспособность (%) микропобегов и регенерантов сортов *P. domestica* через 40 суток термотерапии

Как известно, нормальный рост и развитие во время термотерапии являются важными показателями жизнеспособности растений [13, 17, 18]. Исследованиями показана возможность увеличения прироста растений во время термотерапии при введении в питательную среду МС-3 гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 5,77 мкМ. При этом прирост растений вишни увеличивался, в среднем, на $1,5 \pm 0,12$ см, что на 44,9% больше по сравнению с контролем.

В результате проведенной термотерапии *in vitro* получены безвирусные растения вишни сортов Подбельская, Чернокорка, Эрди Ботермо, Коросска и сливы сортов Стенлей, Гвардейская Синяя, Персиковая, Венгерка Юбилейная. Преимущество термотерапии в условиях *in vitro* по сравнению с традиционной термотерапией достаточно велико. Сроки получения оздоровленных растений сокращаются с 1-2 лет до 4-5 месяцев. При этом состав питательной среды и воздействие биологически активных веществ играют существенную роль в повышении жизнеспособности растений вишни и сливы в условиях экстремальных температур. Все это следует учитывать при оздоровлении косточковых плодовых культур от вирусных инфекций.

Спустя 4 месяца после адаптации проводили ретестирование оздоровленных растений. Как показали наши исследования, другим не менее эффективным биотехнологическим приемом оздоровления растений от вирусных инфекций является сочетание методов хемотерапии *in vitro* и культуры органов и тканей растений. Испытание вироцидов проводили на 2 сортах вишни (Подбельская, Чернокорка) и 2 сортах сливы (Персиковая, Стенлей), пораженных вирусами PNRSV и PDV, кроме того, сорт сливы Стенлей был инфицирован вирусом шарки (PPV). Экспланты (вегетативные почки), отобранные с зараженных деревьев в период выхода их из состояния покоя, культивировали на среде МС-2. Результаты опытов по эффективности применения вироцидов: виразола (рибавирина) и НЕО-DHT представлены в таблице 3, из которой видно, что оба вироцида оказались эффективными против вирусов некротической кольцевой пятнистости (PNRSV), карликовости (PDV) и шарки сливы (PPV).

Таблица 3

Результаты хемотерапии *in vitro* вишни сорта Подбельская и сливы сортов Персиковая и Стенлей

Вироцид, концентрация	Количество безвирусных растений / общее количество тестируемых растений (%)				
	Подбельская		Персиковая		Стенлей
	PNRSV	PDV	PNRSV	PDV	PPV
Контроль	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)	0/21 (0)
Виразол:					
1 мг/л	0/19 (0)	0/19 (0)	0/18 (0)	0/18 (0)	0/21 (0)
5 мг/л	0/20 (0)	0/20 (0)	1/17 (5,8)	2/17 (11,8)	1/20 (5,0)
10 мг/л	3/19 (15,8)	1/19 (5,3)	4/17 (23,5)	3/17 (17,6)	6/20 (30,0)
20 мг/л	17/18 (94,4)	15/18 (83,9)	9/11 (81,8)	7/11 (63,6)	16/21 (78,2)
50 мг/л	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
НЕО-DHT:					
50 мг/л	11/18 (61,1)	12/18 (66,7)	14/19 (73,6)	15/19 (78,9)	1/20(5,0)
85 мг/л	10/16 (62,5)	10/18 (55,6)	13/16 (81,3)	12/16 (75,0)	16/20 (80,0)
100 мг/л	11/17 (64,1)	12/16 (75,0)	10/12 (83,3)	11/12 (91,6)	-

С повышением концентрации вироцидов (виразола выше 20 мг/л и НЕО-DHT выше 100 мг/л) обнаружено их высокое фитотоксическое действие. Это проявлялось в значительном угнетении роста и развития и отмирании апикальной части микропобегов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Персиковая и Стенлей (рис. 3, 4).

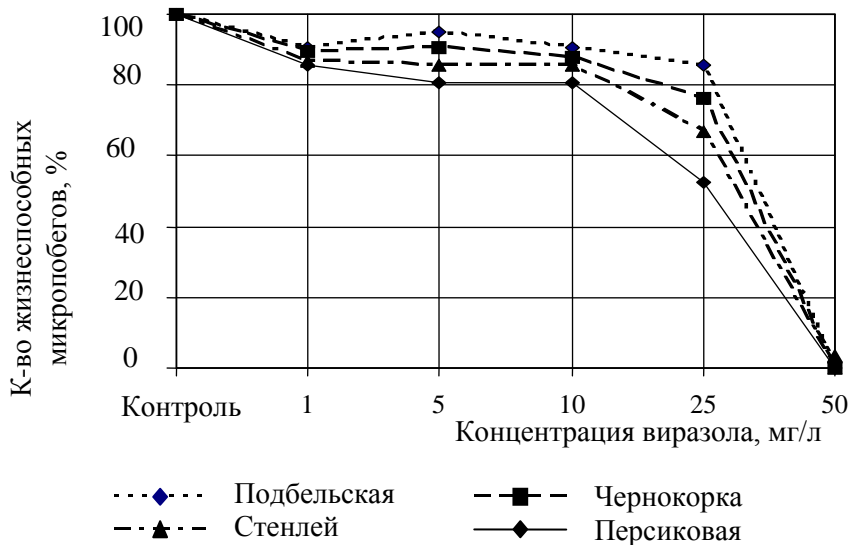


Рис. 3. Жизнеспособность микропобегов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Стенлей и Персиковая при введении в питательные среды виразола

После трех недель культивирования *in vitro* с ингибиторами вирусов микропобеги пассировали на питательную среду МС-3, на которой происходило укоренение. Затем, спустя 4 месяца после их адаптации в условиях *in vivo*, растения вишни и сливы ретестировали на отсутствие вирусов с использованием метода ELISA, который подтвердил элиминацию PDV, PNRSV и PPV в опытах с виразолом в концентрации 20 мг/л и оздоровление от PDV и PNRSV в опытах с НЕО-DHT в концентрации 100 мг/л, а от вируса шарки (PPV) эффективной была концентрация НЕО-DHT 85 мг/л (табл. 3).

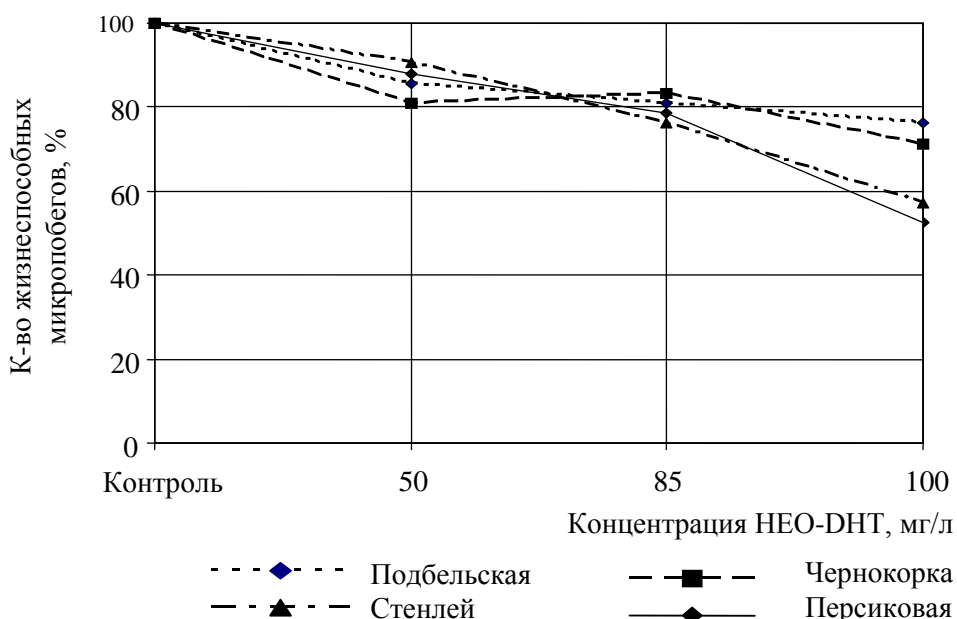


Рис. 4. Жизнеспособность микробов вишни сортов Подбельская и Чернокорка и сливы сортов Стенлей и Персиковая при введении в питательные среды НЕО-DHT

Проведенные эксперименты показали эффективность совместного применения ингибиторов вирусов и культивирования *in vitro* вишни и сливы, что согласуется с ранее полученными нами и другими авторами данными [11, 12, 14, 19].

Таким образом, разработанные биотехнологические приемы оздоровления 8 сортов вишни и сливы, при сочетании методов термотерапии *in vitro* с культурой органов и тканей и хемотерапии *in vitro* с культурой органов и тканей, показали высокую эффективность получения исходного материала, свободного от вредоносных сокопереносимых вирусов *Prune dwarf virus* (PDV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) и *Plum pox potyvirus* (PPV).

Список литературы

1. Бондаренко П.Е. Вирусные болезни яблони, черешни и вишни в лесостепи Украинской ССР и отбор безвирусных клонов: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Киев, 1985. – 19 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Гнутова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. – М.: Наука, 1985. – 184 с.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
5. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Вердеревская Т.Д. Плодовые культуры // Борьба с вирусными заболеваниями растений: Пер. с нем. – М.: Агропромиздат, 1986. – С. 326-356.
6. Лукичева Л.А. Использование ингибиторов вирусов для оздоровления сливы в условиях *in vitro* // Пути решения проблем и перспективы развития биотехнологии в декоративном садоводстве и плодоводстве: Тезисы докл. Междунар. конф., Ялта, 25-26 сентября 1997. – Ялта, 1997. – С. 36.
7. Лукичева Л.А. Особенности клонального микроразмножения безвирусных сортов вишни и сливы // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 34-45.
8. Лукичева Л.А., Митрофанов В.И. Оздоровление вишни и сливы методом термотерапии *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада – 2002. – Вып. 86. – С. 59-61.
9. Митрофанова О.В., Михайлов А.П., Чехов А.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически

важных многолетних культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.

10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.

11. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта. – 2000. – 46 с.

12. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111-120.

13. Помазков Ю.И., Литвиненко И.С. Вирусные болезни плодовых культур и меры борьбы с ними // Сельскохозяйственная биология. – 1974. – Т. 9, № 5. – С. 643-647.

14. Тесленко А.В., Митрофанова О.В., Лукичева Л.А. Разработка технологий получения безвирусного посадочного материала персика // Труды Никит. ботан. сада. – 1986. – Т. 99. – С. 85-92.

15. Цуркан И.Г. Термическая терапия плодовых, ягодных культур и винограда, пораженных вирусами // Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев: Картя молдавеняскэ, 1973. – С. 68-125.

16. Цуркан И.Г., Бивол Т.Ф. Термотерапия латентных вирусов яблони и её эффективность // Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых, ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинев, 1983. – С. 64-72.

17. Cieslinska M., Zawadzka B. Preliminary results of investigation on elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy *in vitro* // Phytopathol. Pol. – 1999. – Vol. 17. – P. 41-48.

18. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. – 1977. – Vol. 34, N 3. – P.475-483.

19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3 – P. 473 – 497.

20. Nemeth M. Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees. – Budapest: Akademiai Kiado, 1986. – 841 p.

21. Richter J. Serology // Klinkowski M. Pflanzliche virologie. – Berlin: Akademie-Verlag, 1980. – Bd. 1. – S.354-382.

Biotechnological methods of cleaning up cultivars of cherry (*Prunus cerasus* L.) and plum (*Prunus domestica* L.)

Lukichyeva L.A., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P.

The biotechnological methods of cherry and plum plants cleaning up from viruses (PDV, PNRSV, PPV) on the basis of complex application of thermo-, chemotherapy *in vitro* methods and tissue and organ culture have been recommended.