

УДК 634.25:578.864:58.082

ВИРУСЫ *PRUNUS PERSICA* (L.) BATSCH И ПУТИ ОЗДОРОВЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ

С.А. МАРТЫНОВ, О.В. МИТРОФАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр
 Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт Никита
 e-mail: in_vitro@ukr.net

На изучаемых сортах персика выявлены вирусы, причиняющие экономический ущерб косточковым плодовым культурам. Показана возможность оздоровления четырёх сортов персика путем применения метода хемотерапии in vitro. Определены оптимальные условия стерилизации исходных эксплантов, сроки введения в условия in vitro, обеспечивающие активную регенерацию микропобегов.

Ключевые слова: вирусы, персик, хемотерапия, микроразмножение, in vitro.

Введение. Ранее проведенными исследованиями в Крыму установлена высокая степень поражения промышленных и ценных коллекционных насаждений персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) вирусными болезнями [1–3]. В связи с этим, наряду с разработкой методов ранней и точной диагностики, важное место занимают биотехнологические приёмы оздоровления и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала. Метод оздоровления растений через культуру меристемы не всегда обеспечивает возможность получения безвирусных мериклонов. В последние годы всё большее значение в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала приобретает метод культуры изолированных органов и тканей растений в сочетании с хемотерапией [4, 5].

Разработанная в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре (НБС-ННЦ) модель системы освобождения растений от вирусов позволила получить безвирусный посадочный материал цветочных и некоторых косточковых плодовых культур [6]. При оздоровлении сортов персика все еще существует ряд трудностей. Прежде всего это связано с сильным загрязнением тканей экзогенной и эндогенной микрофлорой, отсутствием эффективных питательных сред и недостаточной изученностью процессов морфогенеза персика в условиях *in vitro* [7, 8].

Цель данного исследования состояла в определении основных вирусов и вирусных болезней на изучаемых сортах персика и разработке путей оздоровления растений в условиях *in vitro* на этапах введения первичных эксплантов и регенерации микропобегов.

Материалы и методы

Работа выполнялась в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биохимии и биотехнологии растений НБС-ННЦ. Объектами исследования служили деревья персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) четырех перспектив-

ных сортов: Золотая Москва, Памятный Никитский, Орфей и Лакомый. Для идентификации вирусов в отобранных во время обследования сортообразцах использовали биологический метод тестирования на травянистых растениях-индикаторах *Chenopodium foetidum* Shrad., *Ch. quinoa* Willd., *Cucumis sativus* L. сорта 'Delikatess' (рис. 1, в), *Nicotiana clevelandii* A.Gray и систему Пиротест ИФА («Иммунотех», Россия). Для повышения эффективности механической передачи вирусной инфекции на растения-индикаторы инокулюм готовили в 0,1 М фосфатном буфере Серенсена pH 5,6 с вирусстабилизирующими добавками.

Растительный материал для введения в условия *in vitro* отбирали в различные фазы вегетации деревьев. Первичными эксплантами в летнее время (июнь-июль) служили верхушки активно растущих побегов длиной 0,5 – 1 см. Вегетативные почки отбирали в течение всего года.

При освобождении первичных эксплантов от экзогенной и эндогенной инфекции применяли последовательную ступенчатую стерилизацию. Вначале первичные экспланты помещали в растворы 70 %-ного C_2H_5OH («Медасепт», Украина), затем – коммерческого препарата «Domestos» (Россия) – активное вещество $NaClO$ в соотношении 1:1; 1,5:1 и 2:1 с добавлением 2-х капель детергента Tween-80 и последующей 4-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Для ингибирования вирусов в питательные среды добавляли вироциды: рибавирин («Астрафарм», Украина) в концентрации 1–15 мг/л и НЕО-DHT (Германия) (2, 4 – диоксогексагидро – 1, 3, 5 – триазин) в концентрации 50–150 мг/л. В условиях ламинарного бокса *Fatran Lf* (Чехия) экспланты помещали на поверхность питательных сред PE и PM, модифицированные в лаборатории на основе ба-

зовой питательной среды Гамборга (B5) [9]. Питательные среды содержали 1–3 мг/л БАП («Sigma», США), 0,05–0,1 мг/л β -ИМК («Sigma», США), 30 мг/л сахарозы и 10 мг/л агар-агара (Испания), pH 5,6. Колбы и пробирки с эксплантами помещали в культуральное помещение с постоянной температурой воздуха 23 ± 1 °C, освещенностью 2–3 клк и 16-ти часовым фотопериодом. Каждый эксперимент проводился трижды в 10-кратной повторности.

Результаты и обсуждение

Проведенные весенне-летние обследования насаждений персика позволили выявить различные симптомы проявления вирусных болезней. Чаще других были отмечены некротические и хлоротические пятнистости листьев (рис. 1, б), межжилковый хлороз, бугристость плодов, усыхание скелетных ветвей и отдельных деревьев (рис. 2). Сравнительно редко проявлялись признаки поражения в виде ярких колец на плодах, хлоротических колец и дуг на листьях. На цветках отмечена пестролепестность (рис. 1, а).

Для идентификации вирусов персика в отобранных сортообразцах использовали растения-индикаторы и систему Пиротест ИФА. Нами были идентифицированы наиболее вредоносные вирусы: *Plum pox virus* (PPV, род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*) – на сортах Золотая Москва и Орфей, *Prune dwarf virus* (PDV, род *Ilarvirus*, семейство *Bromoviridae*) – на сорте Памятный Никитский, *Arabis mosaic virus* (ArMV, род *Nepovirus*, семейство *Comoviridae*) – на сорте Лакомый.

Оздоровление сортов персика от вирусных инфекций осуществляли путем введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*. Этот процесс состоял из нескольких этапов.

Экспериментально нами установлено, что применение известных методов стерилизации для плодовых культур не дава-

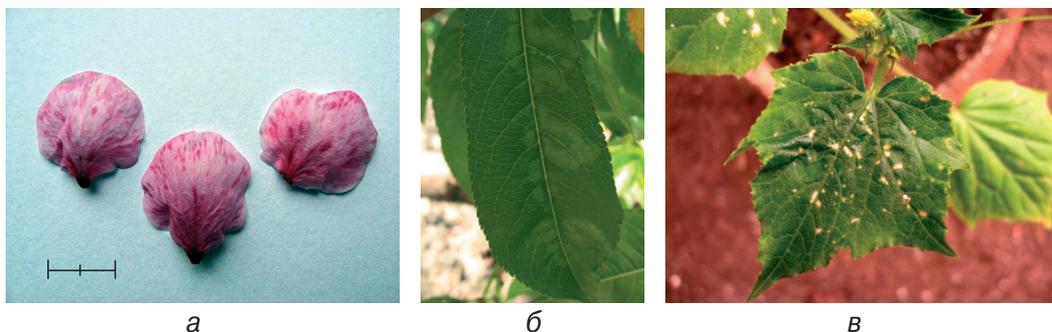


Рис. 1. Симптомы проявления вирусной болезни на персике и растении-индикаторе: а – пестролепестность персика (длина линейки 1 см); б – хлоротические пятна на листьях персика; в – системная мозаика на *Cucumis sativus* L. сорта 'Delikatess' после инокуляции соком из листьев пораженного вирусом сорта Лакомый



Рис. 2. Внешний вид пораженных вирусами деревьев персика

ло положительных результатов, так как наблюдалась низкая жизнеспособность эксплантов и высокая степень заражения грибной и бактериальной инфекциями. При этом отмечено выделение фенолов в основании эксплантов на этапах введения и культивирования на питательных средах. Это явление усиливалось действием стерилизующих агентов. Поэтому был проведен ряд опытов, которые позволили отработать режим стерилизации растительного материала в зависимости от происхождения первичного экспланта и фазы вегетации растения. Наиболее эффектив-

ной оказалась ступенчатая стерилизация эксплантов. Определяющее значение для успешной стерилизации эксплантов имели концентрация и соотношение используемых реагентов. Как показали наши исследования, для вегетативных почек оптимальная концентрация NaClO составляла 2:1 в течение 18 мин, а для верхушек активно растущих побегов – 1,5:1 в течение 7 мин (табл. 1).

Для ингибирования обнаруженных вирусов изолированные меристемы и верхушки активно растущих побегов помещали на модифицированную питательную

Таблица 1. Влияние режима стерилизации первичных эксплантов персика на освобождение от экзогенной и эндогенной инфекций

Комбинация стерилизующих агентов	Время стерилизации, мин	Количество эксплантов, %		
		инфицированных	потемневших	развившихся
<i>Вегетативные почки</i>				
70 % C ₂ H ₅ OH NaClO 1:1	1	59	3	38
	18			
70 % C ₂ H ₅ OH NaClO 1,5:1	1	48	7	45
	18			
70 % C ₂ H ₅ OH NaClO 2:1	1	14	14	72
	18			
70 % C ₂ H ₅ OH NaClO 1,5:1 0,1 % Thimerosal	1	1	75	24
	18			
	10			
<i>Верхушки активно растущих побегов 0,5–1 см</i>				
70 % C ₂ H ₅ OH NaClO 1,5:1	1	21	31	48
	7			
70 % C ₂ H ₅ OH 0,1 % Thimerosal	1	40	24	36
	4			

среду В5, дополненную вирицидами: НЕО-DHT в концентрации 50–150 мг/л и рибавирином в концентрации 1–15 мг/л. Результаты по эффективности применения вирицидов представлены в табл. 2. Из данных таблицы видно, что с повышением концентраций вирицидов (рибавирина выше 10 мг/л и НЕО-DHT выше 100 мг/л) обнаружено их высокое фитотоксическое действие на состояние микропобегов. При этом происходило значительное угнетение их роста, отмирала апикальная часть, некоторые микропобеги оводнялись и погибали. Оптимальными концентрациями НЕО-DHT и рибавирина были 100 мг/л и 5 мг/л соответственно.

Как показали наши исследования (рис. 3), у всех четырех сортов персика изолированные меристемы из пазушных почек активнее развивались на питательной среде РМ в период выхода растения из состояния покоя (март) – от 75 % у Лакомого до 85 % у Памятного Никитского. В летний период успешная регенерация микропобегов была отмечена на питательной среде РЕ при культивировании

верхушек активно растущих побегов сортов Золотая Москва – 65 % и Лакомый – 73 %.

Таблица 2. Влияние рибавирина и НЕО-DHT на оздоровление персика *in vitro*

Вирицид и его концентрация, мг/л	Количество изолированных апикальных меристем, шт.	Количество полученных и оздоровленных* микропобегов, шт.
Контроль	20	18
Рибавирин*		
1	20	17
3	20	16
5	20	16
10	20	12
15	20	1
НЕО-DHT*		
50	20	18
85	20	15
100	20	11
150	20	4

Примечание. *При обработке рибавирином и НЕО-DHT

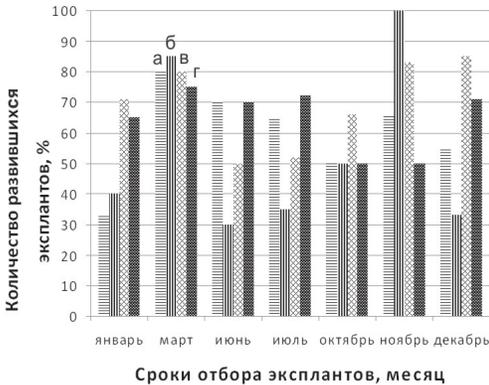


Рис. 3. Влияние сроков отбора на развитие эксплантов персика в условиях *in vitro*: а – Золотая Москва; б – Памятный Никитский; в – Орфей; г – Лакомый

Начало роста микропобегов наблюдали на 7–8 сут культивирования (рис. 4, а). Затем формировалась розетка листьев. Через 15 сут листья на развивающемся микропобеге сильно удлинялись (рис. 4, б).

Отсекая нижние листья индуцировали рост микропобегов. Адвентивные микропобеги начинали активно регенерировать после 4-го пассажа. Интенсивность побегообразования увеличивалась при добавлении в среду 1 мг/л БАП.



Рис. 4. Этапы морфогенеза микропобегов персика: а – розетка листьев; б – удлинение и хлороз нижних листьев; в – адвентивное побегообразование

Выводы

Выявлены наиболее вредоносные вирусы на изучаемых сортах персика. Подобраны режимы стерилизации первичных эксплантов раствором NaClO: верхушек активно растущих побегов – 7 мин, вегетативных почек – 18 мин. Показано, что оптимальным сроком введения первичных эксплантов четырех сортов персика в условия *in vitro* является март. Определены оптимальные концентрации вирицидов для проведения хемотерапии и оздоровлены сорта персика Золотая Москва, Памятный Никитский, Орфей и Лакомый в условиях *in vitro*.

Список литературы

1. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Ежов В.Н. и др. 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.
2. Митрофанова О.В., Тесленко А.В. Диагностика вирусных болезней персика в Крыму // Труды Никит. ботан. сада. – 1982. – Т. 87. – С. 89–99.
3. Воронин Э.И. Вирусные и микоплазменные болезни плодовых культур в Крыму // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1977. – Т.59. – Вып. 2. – С. 147–152.

4. Митрофанова О.В., Смирнова Т.А., Ильницкий О.А. Термотерапия плюс меристемная культура // Цветоводство. – 1978. – № 3. – С.11–12.
5. Куликов И.М., Упадышев М.Т. Экономическая оценка современных способов тестирования и оздоровления ягодных и плодовых культур // Садоводство и виноградарство. – 2010. – № 6. – С. 20–24.
6. Митрофанова О.В., Славгородская-Курлиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичёва Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приёмы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.
7. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка. – 1992. – 232 с.
9. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – Vol. 46, № 5. – P. 417–421.

Представлена В.А. Кунахом

Поступила 28.03.2011

ВІРУСИ *PRUNUS PERSICA* (L.) BATSCH
ТА ШЛЯХИ ОЗДОРОВЛЕННЯ РОСЛИН

С.О. Мартынов, О.В. Митрофанова

Нікітський ботанічний сад – Національний науковий центр

Україна, 98648, АР Крим, м. Ялта, смт Нікіта

e-mail: in_vitro@ukr.net

На досліджуваних сортах персика виявлені віруси, які заподіюють економічний збиток кісточковим плодовим культурам. Показана можливість оздоровлення чотирьох сортів персика шляхом застосування методу хемотерапії *in vitro*. Визначено оптимальні умови стерилізації вихідних експлантів, терміни введення в умови *in vitro*, що забезпечують активну регенерацію мікропагонів.

Ключові слова: віруси, персик, хемотерапія, мікророзмноження, *in vitro*.

VIRUSES OF *PRUNUS PERSICA* (L.) BATSCH
AND WAYS FOR PLANTS CLEANING UP

S.A. Martinov, O.V. Mitrofanova

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center

Ukraine, 98648, Crimea, Yalta, Nikita

e-mail: in_vitro@ukr.net

On the studied peach cultivars the viruses that cause economic damage to stone fruits have been revealed. The possibility of four peach cultivars cleaning up by applying the chemotherapy *in vitro* method has been demonstrated. The optimal conditions for the initial explants sterilization, the time of introduction in conditions *in vitro*, providing active microshoots regeneration have been determined.

Key words: viruses, peach, chemotherapy, micropropagation, *in vitro*.