

ВАРИАТИВНОСТЬ ВОСПРИИМЧИВОСТИ СОРТОВ СЛИВЫ К ВИРУСУ ШАРКИ (PPV) ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO* И ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ РАЗМНОЖЕНИИ *IN VIVO*

Бунцевич Л.Л., канд. биол. наук, Винтер М.А.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Реферат. Представлены результаты исследований влияния вируса шарки сливы на растения в процессе размножения. Установлено, что уровень соматической изменчивости вегетативного потомства *in vitro* и *in vivo* сливы определяется не столько восприимчивостью сортов Стенлей и Кубанская ранняя к PPV, сколько их фитосанитарным статусом, то есть фактом наличия или отсутствия вируса в саженцах и микро растениях.

Ключевые слова: слива, вирус шарки (PPV), симптоматика, соматическая изменчивость, культура *in vitro*, саженцы

Summary. Results of researches of a virus of PPV influence the plants in the course of reproduction are presented. It is established that the level of somatic variability of plum vegetative posterity *in vitro* and *in vivo* is defined not so much by susceptibility of varieties of Stanley and Kubanskaya Rannaya to PPV, but too much of their phytosanitary status, that is to say the fact of existence or absence of a virus in saplings and microplants.

Key words: plum-tree, Plum pox potyvirus, symptomatology, somatic variability, culture *in vitro*, saplings

Введение. Возбудитель вируса шарки сливы включен в перечень карантинных объектов ЕОКЗР (Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений), и в перечень ограниченно распространенных объектов Российской Федерации. В РФ ущерб экономике от вируса шарки сливы оценивается более чем в 1 млрд. рублей [1, 2]. Эффективных способов борьбы с вирусом шарки сливы до сих пор не найдено. На сегодняшний день наиболее действенным способом борьбы, дающим долговременный эффект, является выведение и внедрение в производство иммунных и высокоустойчивых форм и сортов сливы [3, 4]. Степень устойчивости растений к патогенам может колебаться от почти полного иммунитета до почти полной восприимчивости. Такое свойство, как толерантность, представляет собой одну из форм восприимчивости растений к инфекциям, представляющую собой генетически опосредованное свойство растений, проявляющееся частичной устойчивостью, сочетающей инфицированность организма хозяина и выживаемость, высокую степень сохранности жизненных функций заражённых растений [5].

В отличие от восприимчивых, у толерантных растений вирусная инфекция проявляется симптоматически, но не затрагивает функциональное состояние заражённых организмов. В то же время толерантность не является стабильным состоянием как в онтогенезе растения, так и в ходе вегетативного размножения (в ходе генеративного размножения это свойство меняется существенно). Исследование изменения соматических параметров в связи с особенностями восприимчивости к вирусам в ходе вегетативного размножения представляет значительный интерес для плодовых культур, размножаемых окулировкой, другими видами прививок и прочими способами в связи с большим экономическим значением вирусных инфекций, в частности вируса шарки сливы.

В практике питомниководства садовых культур в ходе размножения растений методом окулировки зачастую наблюдается внешнее оздоровление части саженцев от призна-

ков вирусоносительства. Подобное освобождение вегетативного потомства от симптомов заражения вирусами может свидетельствовать о сильной толерантной реакции при латентном течении инфекционного процесса, или же о полной инаktivации вирусных частиц в растениях-клонах. Проблема эта мало исследована. В литературных источниках гораздо более проработана тема оздоровления растений в ходе клонального микроразмножения *in vitro* методом меристем [6-8].

В целях получения более достоверных данных при изучении соматической изменчивости сливы и условий, определяющих рост и развитие здоровых и инфицированных растений, исследования проводились в условиях изоляции растений от внешней среды в культуре *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Деревья сортов сливы Стенлей и Кубанская ранняя (здоровые и инфицированные вирусом шарки сливы) использованы в качестве исходных для размножения в культуре *in vitro* и выращивания здоровых и заражённых *PPV* саженцев методом окулировки. Диагностика на вирусоносительство вируса шарки сливы *PPV* проводилась методом ОТ-ПЦР с помощью диагностических наборов ООО «Агродиагностика» [9]. Клональное микроразмножение осуществляли по общепринятым методикам [10, 11]. В качестве питательной среды использована среда Мурасиге-Скуга. Биометрические исследования проводились по общепринятой методике сортоизучения [12].

Обсуждение результатов. После определения вирусологического статуса растений в культуру *in vitro* вводились экспланты, изолированные из заражённых вирусом шарки сливы (*PPV*), маточных деревьев и деревьев, свободных от *PPV*.

В результате установлено, что в культуре *in vitro* апексов, изолированных от маточных деревьев – вирусоносителей *PPV*, приживается на 20 % меньше, чем апексов от здоровых маточных деревьев. Кроме того, использование на этапе введения в культуру модифицированной среды с янтарной кислотой (4 мг/л) повышает эффективность интродукции эксплантов *in vitro*. В целом приживаемость апексов обоих сортов на среде с янтарной кислотой выше 6 % независимо от их вирусологического статуса (рис.).

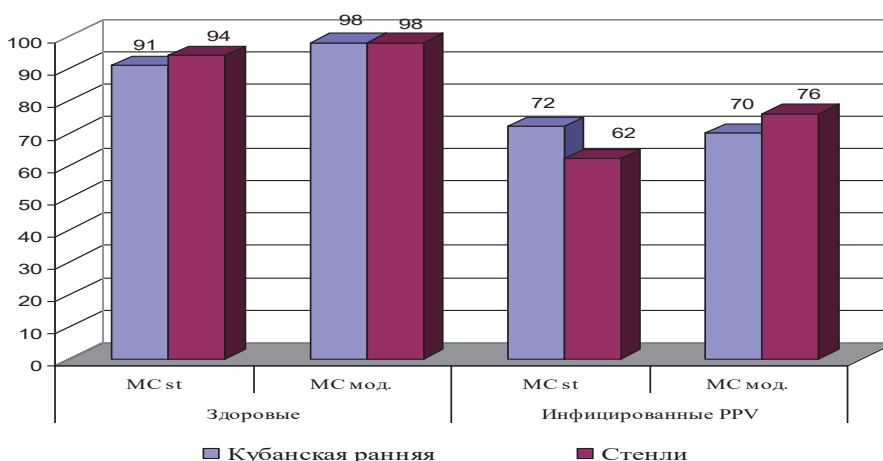


Рис. Результаты интродукции *in vitro* эксплантов сливы сортов Кубанская ранняя и Стенлей с различным вирусологическим статусом

Эффективность клонального микроразмножения эксплантов сливы сортов Кубанская ранняя и Стенлей, интродуцированных в культуру *in vitro* от здоровых и заражённых шаркой маточных деревьев, существенно зависит от фитосанитарного вирусологического статуса эксплантов. При клональном размножении от здоровых мериклонов получается в 9 раз больше микрорастений, чем от мериклонов-вирусоносителей *PPV* (табл. 2).

Таблица 2 – Эффективность клонального микроразмножения эксплантов сливы сортов Кубанская ранняя и Стенлей, интродуцированных в культуру *in vitro* от здоровых и заражённых шаркой маточных деревьев

Сорт	Среда	Отобрано эксплантов, шт.	Размножено за 3 пассажа	
			шт.	коэфф.размножения
Здоровые микропобеги				
Кубанская ранняя	МС (st)	10	271	3,00
Кубанская ранняя	МС мод.	10	298	3,10
Стенлей (стандарт)	МС (st)	10	304	3,12
Стенлей (стандарт)	МС мод.	10	325	3,19
Инфицированные <i>PPV</i> микропобеги				
Кубанская ранняя	МС (ст.)	10	27	1,40
Кубанская ранняя	МС мод.	10	34	1,50
Стенлей (стандарт)	МС (ст.)	10	32	1,48
Стенлей (стандарт)	МС мод.	10	40	1,59

Добавление янтарной кислоты в состав питательной среды (4 мг/л) повлияло на эффективность размножения эксплантов *in vitro*, хотя и незначительно: повысился коэффициент размножения на 0,08 единиц у сорта Стенлей и сорта Кубанская ранняя, в среднем, по здоровым вариантам, и на 0,12 единиц – у инфицированных вариантов.

Для оценки влияния вируса шарки сливы на соматические параметры мериклонов экспериментальных сортов сливы *in vitro* в связи с их восприимчивостью к *PPV* измерены морфометрические показатели размноженных мериклонов (табл. 3).

Таблица 3 – Морфометрические показатели размноженных *in vitro* мериклонов сливы сортов Кубанская ранняя и Стенлей, изолированных из здоровых и заражённых шаркой маточных растений

Сорт	Среда	Показатели		
		высота, см	количество листочков, шт	общее состояние, балл
Здоровые микропобеги				
Кубанская ранняя	МС (st)	4,5	6,2	4,3
Кубанская ранняя	МС мод.	4,4	7,3	4,6
Стенлей (стандарт)	МС (st)	4,8	7,1	4,5
Стенлей (стандарт)	МС мод.	4,9	7,1	4,8
Инфицированные <i>PPV</i> микропобеги				
Кубанская ранняя	МС (st)	3,1	3,3	1,9
Кубанская ранняя	МС мод.	3,0	3,2	2,1
Стенлей	МС (st)	3,3	2,7	2,0
Стенлей	МС мод.	3,5	3,6	2,0

Учитывали высоту микропобегов (см, в среднем), количество листочков на микропобег (шт, в среднем), число микропобегов в микрорастении (шт, в среднем), общее состояние по пятибалльной шкале.

Средняя высота микропобегов в вариантах со здоровыми микрорастениями составляет 4,7 см, что существенно превышает высоту микропобегов у инфицированных микрорастений (3,2 см). Между микрорастениями, выращенными на стандартной среде и модифицированной, различия по средней высоте микропобегов отсутствуют. По облиственности микропобегов различия между здоровыми микрорастениями (6,9 листочков на микропобег) и инфицированными (3,2 листочка) существенны. Различия между сортами

по облиственности на микропогреб (в среднем) незначительны: у здоровых микрорастений сливы сорта Стенлей число листочков на 0,35 шт. больше, чем у сорта Кубанская ранняя, у инфицированных, наоборот, на 0,1 листочек меньше. Оценка общего состояния является интегральным показателем качества микрорастений. По результатам третьего пассажа, состояние здоровых микрорастений оценили, в среднем, на 4,6 баллов, что является высокой оценкой и свидетельствует о хорошем качестве мериклонов. Состояние микрорастений, выращенных из инфицированных эксплантов, значительно хуже и составляет только 2 балла (см. табл. 3).

Исследование состояния и биометрических параметров саженцев как критериев толерантности сортов сливы к вирусу шарки (PPV) проводилось при вегетативном размножении на саженцах, выращенных из глазков, заражённых вирусом шарки (PPV) маточных деревьев и маточных деревьев, свободных от вируса шарки сливы. В ходе морфометрических исследований заражённых и здоровых саженцев измерялись параметры, наиболее полно отражающие состояние растений: высота саженцев, диаметр штамбика над местом прививки (окулировки), число разветвлений (боковых побегов), суммарная длина боковых побегов растения (табл. 4). Промеры выполнялись в период максимального развития саженцев, незадолго до выкопки 16 сентября 2018 года. Обращает на себя внимание значительная разница в высоте саженцев сортов Стенлей (161 см в среднем) по сравнению с сортом Кубанская ранняя (150 см в среднем), что может быть обусловлено как генетически опосредованной силой роста растений, так и различной восприимчивостью к вирусной инфекции.

Не менее точной характеристикой эффективности ростовых процессов является прирост диаметров штамбиков. У здоровых саженцев экспериментальных сортов средний диаметр штамбиков составил 2,4 см, у больных – 2,0 см (см. табл. 4), что свидетельствует об угнетении роста растений сливы размножившимися вирусами шарки. Подобно природным штамбикам способность к побегообразованию под воздействием вирусной инфекции снижается незначительно: число боковых побегов у заражённых саженцев меньше, в среднем, на 0,5 шт., по сравнению со здоровыми. У саженцев сорта Кубанская ранняя (здоровых и заражённых) побегообразование развито несколько сильнее: на растениях развивается 8 боковых побегов, тогда как у саженцев сорта Стенлей – 5,5 разветвлений. Известно, что способность к побегообразованию при прочих равных условиях определяется сортовыми наследуемыми свойствами.

Таблица 4 – Соматические параметры (в среднем) здоровых и заражённых вирусом шарки сливы (PPV) саженцев сортов Стенлей и Кубанская ранняя (16.09.2018 г.)

Сорт	Число саженцев, шт.	Высота саженцев, см	Диаметр штамба, см	Количество боковых побегов, шт.	Суммарная длина боковых побегов, м	Общее состояние, балл
Инфицированные саженцы						
Стенлей	51	149	2,1	5	1,5	3,1
Кубанская ранняя	53	141	1,9	8	1,3	2,9
В среднем	52	145	2,0	6,5	1,40	3,0
Здоровые саженцы						
Стенлей	49	173	2,3	6	2,1	4,8
Кубанская ранняя	47	160	2,5	8	2,4	4,8
В среднем	48	166	2,4	7,0	2,25	4,8

Наиболее полно негативное влияние шарки сливы на соматические характеристики растений характеризует параметр «суммарная длина боковых побегов». У здоровых саженцев она составляет 2,25 м, что существенно больше, чем суммарная длина боковых побегов саженцев, заражённых шаркой сливы, – 1,40 м (см. табл. 4).

Выводы. Установлено, что изменения соматических параметров экспериментальных сортов сливы в культуре *in vitro* более всего опосредованы фитосанитарным статусом, то есть фактом циркуляции (или отсутствия) вируса в организме опытных растений, а не уровнем их восприимчивости к вирусу шарки сливы (*PPV*). У инфицированных растений снижается уровень интродукции эксплантов *in vitro* и эффективность мультипликации микропобегов, ухудшается общее состояние микропобегов, отражающееся на их силе роста и облиственности. В отличие от результатов, полученных в культуре *in vitro*, фитосанитарный статус саженцев *in vivo* менее важен для формирования соматических характеристик растений. Так, заражение вирусом шарки сливы существенно влияет только на высоту, суммарную длину побегов и общее состояние саженцев. Различная восприимчивость экспериментальных сортов к вирусу не отразилась на изменчивости соматических параметров саженцев непосредственно, влияние сорта на диаметр штамбиков, количество и суммарную длину побегов прослеживается только во взаимодействии с фитосанитарным статусом.

Разница в высоте саженцев сортов Стенлей (161 см в среднем) и Кубанская ранняя (150 см в среднем) может быть обусловлена как генетически опосредованной силой роста растений, так и различной восприимчивостью к вирусной инфекции. Таким образом, уровень соматической изменчивости вегетативного потомства *in vitro* и *in vivo* сливы определяется не столько признаком восприимчивости изучаемых сортов к *PPV*, сколько их фитосанитарным статусом, то есть фактом наличия или отсутствия вируса в саженцах и микро-растениях.

Литература

1. Кулешова Ю.Г., Рынза Ю.Г. Вирус шарки сливы на территории Российской Федерации // Защита и карантин растений. – 2010. №10. С. 35-36.
2. Магомедов У.Ш., Мазурин Е.С., Миронова М.К. Экономический ущерб от карантинных вредных организмов в России // Карантин растений. Наука и практика. 2013. № 2(4). С. 8-12.
3. Wong W., Barba P., Álvarez C., Castro Á. [et al.]. Evaluation of resistance of transgenic C5 Plum (*Prunus domestica* L.) against four Chilean Plum Pox Virus isolates through micro-grafting // Chilean Journal of Agricultural Research. – 2010. – № 70(3). – P. 372-380.
4. Mikhailov R., Serova T., Shulga O., Firsov A., Dolgov S. Pathogen-derived methods for improving resistance of transgenic plums (*Prunus domestica* L.) for Plum pox virus infection. Julius-Kuhn-Archiv. – 2010. – Vol. 427. – P. 133-140.
5. Малиновский В.И. Механизмы устойчивости растений к вирусам. Владивосток: Дальнаука, 2010. 324 с.
6. Куликов И.М., Упадышев М.Т. Пути оздоровления садовых культур от вирусов // Защита и карантин растений. 2015. № 1. С. 10-12.
7. Кузьмина Н. Микроразмножение и оздоровление растений [Электронный ресурс] // Биотехнология (электронный учебник) – 2010. – Режим доступа: http://www.biotechnolog.ru//pcell/pcell6_1.htm (Дата обращения: 23.03.2012 г.).
8. Упадышев, М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Упадышев Михаил Тарьевич. М., 2011. 46 с.
9. Диагностика ряда карантинных фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции с флуоресцентной детекцией результатов при помощи диагностических наборов производства ООО «АгроДиагностика». Методические указания. ФГУ Всероссийский центр карантина растений. М.: 2009. 28 с.
10. Корнацкий С.А. Микроразмножение сортов сливы // Проблемы интенсификации современного садоводства. Мичуринск, 1990. С. 164-165.
11. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. Орёл: ГНУ ВНИИСПК, 2005. 50 с.
12. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур / под общ. ред. Е.Н. Седова и Т.П. Огольцовой. Орёл: ВНИИСПК, 1999. 606 с.