

УДК 634.22:581.1:632.3

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И АНАТОМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЛИСТЬЕВ СЛИВЫ, СВЯЗАННЫЕ С ИНАКТИВАЦИЕЙ ВИРУСА ШАРКИ

Бунцевич Л.Л., канд. биол. наук, Ненько Н.И., д-р с.-х. наук,
Киселева Г.К., канд. биол. наук, Костюк М.А., Беседина Е.Н.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства»
(Краснодар)

Реферат. Представлены результаты исследования отдельных физиолого-биохимических и анатомических особенностей листьев сливы *in vivo* при контаминации вирусом шарки (PPV) в связи с ингибированием вирионов. Установлено, что при окулировке заражённой вирусом сливы 21 % привитых глазков отмирает, 71 % приживается и регенерирует растения, которые проявляют отчётливые признаки заражения вирусом, 8% саженцев не проявляют симптоматику заражения вирусом. Показано, что в листьях бессимптомных растений наблюдается повышенное содержание белка, лигнина, хлорофиллов *a* и *b*, каротина, что может быть связано с ингибированием вируса в живых тканях саженцев сливы.

Ключевые слова: слива, меристема, *in vitro*, *in vivo*, вирус шарки (PPV), ингибирование

Summary. The results of study of physiological and biochemical features of plum leaves *in vivo* at an invasion of a virus of Sharke (PPV) in connection with inhibition of viroes are presented. It is established, that at chip budding of the plum infected by potyvirus, 21 % of the imparted buds died, 71 % get accustomed and regenerate plants, which show distinct symptoms of infection with PPV of plum, 8 % saplings do not show symptoms of virus infection. It is shown that the amount of protein, lignin, chlorophyll *a* and *b*, carotene, it can be connected with inhibition of a virus in living tissues of plum saplings.

Key words: plum, meristem, *in vitro*, *in vivo*, Plum pox potyvirus, ingibition

Введение. В практике питомниководства садовых культур в ходе размножения растений методом окулировки зачастую наблюдается внешнее оздоровление части саженцев от признаков вирусоносительства. Подобное освобождение вегетативного потомства от симптомов заражения вирусами может свидетельствовать о сильной толерантной реакции при латентном течении инфекционного процесса, или же о полной инактивации 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 [1-6]. Ещё в 1969 году Vine и Jones получили здоровые растения хмеля из верхушечных меристем длиной от 0,5 до 5мм, хотя при тестировании эти верхушки давали положительную реакцию на вирусоносительство [7]. Механизм такого оздоровления при вычленении меристем до конца не изучен. Например, Н.М. Абраменко считала, что в некоторых случаях апикальные меристемы развиваются в безвирусные растения не потому, что они безвирусными были при изолировании, но скорее потому, что вирусы в процессе культивирования ингибируются [8].

Подобные представления, разделяемые многими исследователями, инициировали многочисленные исследования роли эндогенных и экзогенных ингибиторов вирусных инфекций растений. Так, И.Т. Балашова пришла к заключению, что противовирусной активностью обладают стероидные гликозиды, в частности пурпуреагитозид, у-гитонин, протоматин, и капсикозид [9], что подтверждено более поздними исследованиями [10].

Современные авторы рассматривают проблему ингибирования вирусов соответственно этапам репродукции вирусов в живых тканях [11]. На этапе проникновения вирусов

в клетку полисахариды и некоторые пептиды, выделяемые растениями, эффективно ингибируют адсорбцию вирионов. При этом противовирусная активность возрастает с возрастанием молекулярной массы в интервале от 1 до 10 kD. При меньших, а также больших массах полисахаридов противовирусная активность резко снижена. Другими группами химических соединений, ингибирующих вирусы, являются тритерпеновые сапонины и полифенольные соединения, препятствующие специфической сорбции вируса на рецепторы.

Основной группой растительных соединений, способных подавлять репродукцию вирусов после проникновения вириона в клетку, являются аналоги силимарина, лютеолина и кверцетина. Этап экспрессии вирусного генома и сборки вирионов при репродукции вирусов успешно блокируется 2 основными группами растительных соединений: ингибиторами РНК полимераз и ингибиторами посттрансляционных модификаций белков. К таким веществам относятся алпизарин, госсипол, эпиген и др. Одним из механизмов блокирования выхода вирионов из инфицированной клетки является использование ингибиторов ферментативной активности вируса, участвующей в почковании вируса. К подобным соединениям относятся коричные и оксикоричные кислоты, галлаты и др. [11].

В настоящей работе представлены результаты изучения отдельных биохимических и анатомических особенностей листьев сливы *in vivo* при заражении вирусом шарки (PPV) в связи с ингибированием вирионов.

Объекты и методы исследований. Исследования по изучению биохимических и анатомических особенностей эндогенной инактивации вируса шарки (PPV) в вегетирующих растениях сливы сорта Кабардинская ранняя проведены на выборке в 200 шт. саженцев. Контроль – размножение тем же методом окулировки здоровой сливы сорта Кабардинская ранняя в количестве 240 шт. Подвой – сеянцы алычи. Исследования проведены в 2014-2015 гг. в ОПХ «Центральное» (г. Краснодар).

Обсуждение результатов. Установлено, что при вегетативном размножении (способом окулировки) сливы, заражённой вирусом шарки (PPV), 8% растений, регенерировавших из глазков, не проявляют симптоматику заражения, что может свидетельствовать о сильной толерантной реакции и латентном вирусоносительстве, или же о полной инактивации вируса в растениях-клонах. При этом 21% привитых глазков отмирает, 71% глазков приживается и регенерирует побеги, несущие отчётливые признаки заражения вирусом шарки сливы, – специфические хлоротичные кольца и узор на листьях (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты переноса вируса шарки сливы PPV путём окулировки, сорт Кабардинская ранняя, 2014-2015 гг.

Вариант	Заокулировано в 2014 г.	Отмирание глазков	Выход саженцев в 2015 г.		
			всего	симптомированные	бессимптомные
1 - здоровые	240 шт. / 100%	22 шт. / 9%	218 шт. / 91%	0	218 шт. / 91%
2 - PPV	200 шт. / 100%	42 шт. / 21%	158 шт. / 79%	142 шт. / 71%	16 шт. / 8%

В контроле (размножение здоровых маточных растений) отмирание глазков наблюдается в 9% случаев, что близко к среднегодовалым показателям для размножения свободных от PPV саженцев сливы сорта Кабардинская ранняя на подвое сеянцы алычи см. табл. 1. Для определения вирусоносительства PPV симптомированные маточные растения сливы диагностированы методом ПЦР-анализа (рис. 1).

MR K+ K- 1 2 3 4 5 6 MR

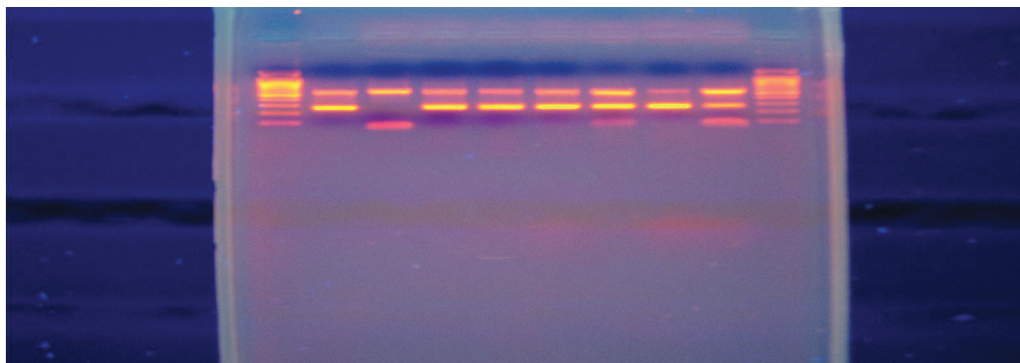


Рис 1 Анализ ампликонов в агарозном геле, 1 - 6: номера образцов; MR: маркер молекулярных масс

Установлено, что выборка тестируемых маточных растений (образцы 1-6) заражена вирусом шарки сливы (PPV). Проведены физиолого-биохимические исследования и микроскопирование листьев симпомированных и бессимптомных растений, результаты анализов представлены в табл. 2, рис. 2.

Таблица 2 – Основные физиолого-биохимические показатели листьев симпомированных и бессимптомных растений сливы сорта Кабардинская ранняя

Вариант	Показатель						
	белок, мг/г СВ	лигнин, %	хлорофилл <i>a</i> , мг/г СВ	хлорофилл <i>b</i> , мг/г СВ	каротин, мг/г СВ	кол-во устьиц на 1 мм ² , шт	оводнённость %
Растения без симптомов	9,34	38	3,83	1,26	1,97	265	64,88
Симпомированные растения	8,84	31	3,30	1,11	0,42	244	62,53

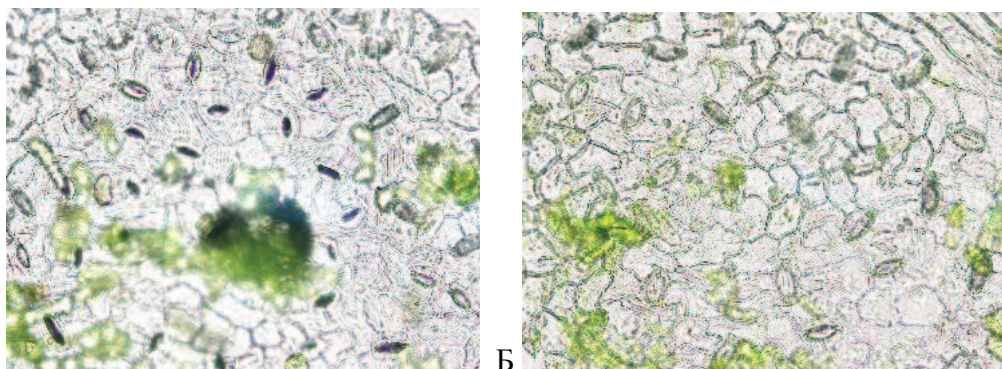


Рис. 2 Микрофото устьичного аппарата, увеличение (10x40) x 2. А – листья без симптомов, Б – симпомированные листья

Из табл. 2 и рис. 2 видим, что в листьях бессимптомных растений повышается содержание белка, лигнина, хлорофиллов *a* и *b*, каротина, количества устьиц, оводнённость тканей. Учитывая, что многими исследователями экспериментально установлено подавление экспрессии вирусов на эндогенном уровне путём усиления синтеза различных соеди-

нений (например, тритерпеновых сапонинов, полифенолов, коричных и оксикоричных кислот и пр.), можно предположить, что выявленная зависимость (повышение содержания белка, лигнина, хлорофиллов *a* и *b*, каротина, количества устьиц, оводнённости тканей в ответ на заражение Plum pox rotavirus) также может быть связана с ингибированием вируса шарки в живых тканях саженцев сливы.

Заключение. В результате проведённых исследований установлено, что при вегетивном размножении (способом окулировки) сливы, заражённой вирусом шарки (PPV), 21% привитых глазков отмирает, 71% приживается и регенерирует растения, несущие признаки заражения вирусом. В то же время 8% саженцев не проявляют симптоматику заражения вирусом, что может свидетельствовать о сильной толерантной реакции и латентном вирусоносительстве, или же о полной инактивации вируса в растениях-клонах.

В результате физиолого-биохимического анализа и микрокопирования выявлены зависимости: в листьях бессимптомных растений, по сравнению с симптомированными растениями-вирусоносителями, наблюдается повышенное содержание белка, лигнина, хлорофиллов *a* и *b*, каротина, увеличение количества устьиц и оводнённости тканей.

Литература

1. Верзилин, А.В. Оздоровление и клональное микроразмножение слаборослых подвоев яблони: монография / А.В. Верзилин, В.А. Минаев, А.М. Тарасов. - Мичуринск: МГПИ, 2007. – 146 с.
2. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.07 / Высоцкий Валерий Александрович. – М., 1998. – 44 с.
3. Джигадло, Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. – Орел, 2005. – 50 с.
4. Митрофанова, О.В. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приёмы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / [Митрофанова О.В., Славгородская-Куприева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А.] – Ялта: Издательство Крым-пресс, 2000. – 45 с.
5. Бунцевич, Л.Л. Производство безвирусного посадочного материала и создание базовых маточных насаждений / Л.Л. Бунцевич, М.А. Костюк Е.Н., Палецкая // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИСиВ, 2012. – №13 (1). – С.31-50. – Режим доступа: <http://www.journal.kubansad.ru/pdf/12/01/05.pdf>.
6. Кузнецова, А.П. Актуальные направления и приоритеты стабильного развития отрасли питомниководства // А.П. Кузнецова, А.С.Романенко // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар: СКЗНИСиВ, 2014. – № 30 (6). – С. 87-94. – Режим доступа: <http://journal.kubansad.ru/pdf/14/06/08.pdf>.
7. Vine, S.J., Jones O.P. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. Hort. Sci.*, 44, 1968.
8. Абраменко, Н.М. Получение безвирусной суперэлиты земляники методом культуры верхушечных меристем / в кн. Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. – Кишинёв, «Картя молдовеняскэ» 1973. С. 26-50.
9. Балашова, И.Т. Стероидные гликозиды как факторы устойчивости к вирусу табачной мозаики // В кн. Вирусные заболевания культурных растений Молдавии. – Кишинёв, «Штиинца», 1984. С. 12-20.
10. Лахматова И.Т. Устойчивость сливы к вирусу шарки / Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. Специальность 06.01.11 — Защита растений – М. 1997. – 24с
11. Богдавленский, А.П., Турмагамбетова А.С., Березин В.Э. Противовирусные препараты растительного происхождения // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6-5. – С. 1141-1145; URL: <http://www.fundamental-research.ru/ru/article/view?id=31703>