

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСИКА (*PRUNUS PERSICA* (L.) VATSCH) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

С.А.МАРТЫНОВ;

О.В.МИТРОФАНОВА, доктор биологических наук

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Промышленные насаждения персика (*Prunus persica* (L.) Batsch) в южных областях Украины и в Крыму представлены в основном сортами селекции Никитского ботанического сада – Национального научного центра НААН Украины (НБС–ННЦ). Преимущество этой культуры перед сортиментом других плодовых деревьев выражается в скороплодности, высоких десертных качествах плодов и декоративности [4].

Вирусные болезни косточковых культур в настоящее время поражают большую часть коллекционных и промышленных насаждений персика. Их вредоносность выражается в снижении урожайности и морозостойкости, ухудшении технологических и товарных качеств плодов, ухудшении приживаемости привоя [2, 3, 8]. Экономический ущерб, причиненный такими инфекциями, может наносить значительный урон современному садоводству. В 60–70-е годы всемирно известным вирусологом Т.Д.Вердеревской были начаты исследования вирусов в Молдове. С середины 80-х годов эти исследования были продолжены в Крыму [8].

В связи с широким распространением и вредоносностью выявленных вирусов возникла необходимость в разработке биотехнологических приемов оздоровления ценных коллекционных и промышленных сортов персика [8]. Метод оздоровления и размножения растений через культуру меристемы не всегда обеспечивает возможность получения безвирусных мериклонов. В последние годы все большее значение в решении вопроса приобретает метод культуры изолированных органов и тканей растений в сочетании с хемотерапией. Такие работы проводились в основном с подвойным материалом. Имеется также ряд сообщений, касающихся эмбриокультуры персика [7]. При этом до сих пор недостаточно разработанным является метод оздоровления сортов персика в культуре *in vitro*. Цель данного исследования состояла в разработке отдельных этапов оздоровления и микроразмножения в условиях *in vitro* безвирусных сортов персика.

Объекты и методы исследования

Работа выполнялась на базе лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС–ННЦ. Объектами данного исследования служили ценные промышленные и перспективные сорта персика из коллекционных насаждений НБС–ННЦ. Это сорта ‘Золотая Москва’ и ‘Советский’, рекомендованные к распространению в Степной зоне Украины и на Южном берегу Крыма, перспективные сорта ‘Памятный Никитский’ и ‘Лакомый’, а также сорт ‘Орфей’.

Оценку пораженности сортов персика выполняли во время полевых обследований, используя общепринятую методику описания симптомов болезни. Все отобранные во время обследования сортообразцы тестировались методом биологического титрования на травянистых растениях-индикаторах *Chenopodium foetidum* Shrad., *Ch. quinoa* Willd., *Cucumis sativus* L. сорта Delikatess, *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana clevelandii* A.Gray. Для идентификации вируса шарки применяли высокоэффективную систему «Пиротест» («Иммунотех», Россия). 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 грибной и бактериальной инфекции применяли последовательную ступенчатую стерилизацию. Для освобождения растений от вирусов был испытан ряд вироцидов, которые добавляли в синтетические питательные среды: рибавирин («Астрафарм», Украина) в концентрации 1–15 мг/л и НЕО-DНТ (Германия) (2, 4-диоксогексагидро-1, 3, 5-триазин) в концентрации 50–150 мг/л. Основой для приготовления питательных сред служила среда Гамборга (B₅) [9]. Модифицированные питательные среды PE и PM содержали 0,5–1 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).

В работе придерживались общепринятых в биотехнологии методов [1, 6]. Колбы и пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с температурой 24±1°C, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк.

Результаты и обсуждение

История изучения вирусных болезней персика в Крыму берет начало с середины 80-х годов XX века. Э.И.Воронин, О.В.Митрофанова, А.В.Тесленко и другие проводили исследования по диагностике и распространению вирусов и вирусных болезней персика в Крыму [8]. Наши исследования подтвердили актуальность этой проблемы и сейчас.

Важной предпосылкой в истории изучения вирусов, поражающих косточковые и другие плодовые культуры, стал этап их переноса на травянистые растения-индикаторы для достоверной идентификации и дальнейшего глубокого изучения. Так, нами после нанесения инокулюма листьев персика (рис. 1, а) на растения-индикаторы (рис. 2) и проведения иммуноферментного анализа «Пиротест» был выявлен вирус некротической кольцевой пятнистости (*Prunus necrotic ring spot virus*), вирус карликовости сливы (*Prune dwarf virus*), вирус мозаики резухи (*Arabis mosaic virus*), вирус шарки сливы (*Plum pox virus*).

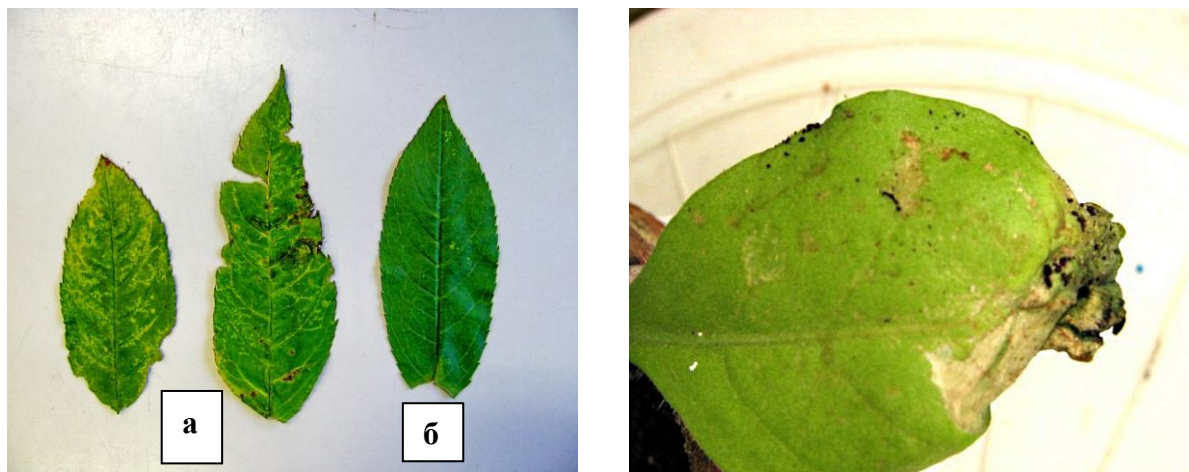


Рис. 1. Листья персика: Рис. 2. *Nicotiana glutinosa* – а – посветление жилок; б – лист без деформация листовой пластинки симптомов вирусной инфекции после инокуляции соком пораженного растения персика

В наших опытах вироциды добавляли в синтетические питательные среды в нашей модификации с последующим введением в них первичных эксплантов, изолированных с вирусных растений персика (верхушки активно растущих побегов,

вегетативные почки) (табл. 1).

Положительные результаты получены при концентрации НЕО-DНТ 85 мг/л в опытах с эксплантами персика, зараженных вирусом некротической кольцевой пятнистости (табл. 1). Оптимальная концентрация рибавирина, при которой микропобеги нормально развивались и освобождались от вирусной инфекции, составляла 5 мг/л. При увеличении концентраций вироцидов происходило значительное угнетение роста микропобегов, оводнение и гибель. Для снятия апикального доминирования и индукции множественного побегообразования был испытан регулятор роста – БАП в концентрации 0,5–1,0 мг/л (табл. 2).

Таблица 1

Влияние рибавирина и НЕО-DНТ на оздоровление персика *in vitro*

Вироцид и его концентрация, мг/л	Количество полученных и оздоровленных микропобегов, %
Контроль	87,5±1,2
Рибавирин	
1	83,5±1,9
3	77,2±1,2
5	82±1,7
10	80±2,4
15	75±1,4
НЕО-DНТ	
50	89±1,9
85	74±2,1
100	54±1,9
150	19±1,8

Таблица 2

Влияние БАП на регенерацию микропобегов сортов персика в культуре *in vitro*

Концентрация БАП, мг/л	Получено микропобегов, шт.		
	Памятный Никитский	Лакомый	Золотая Москва
0,5	1	1	2
1,0	4	4	5

Под воздействием БАП развитие адвентивных почек и побегов у персика протекало по-разному. В том и другом случае коэффициент размножения увеличивался и достигал максимального значения к четвертому пассажу (рис. 3).



Рис. 3. Пролиферация микропобегов персика на среде с 1,0 мг/л БАП

Микропобеги разделяли и высаживали на свежеприготовленную питательную среду для последующего культивирования.

В дальнейшем планируется получить укорененные микропобеги и адаптировать их к условиям *in vivo*.

Выводы

Выявлены наиболее вредоносные вирусы на изучаемых сортах персика.

Установлены концентрации вирицидов и их влияние на жизнеспособность первичных эксплантов и оздоровление сортов персика ‘Золотая Москва’, ‘Советский’, ‘Памятный Никитский’, ‘Орфей’ и ‘Лакомый’ в условиях *in vitro*.

Изучено влияние регуляторов роста на процессы регенерации микропобегов исследуемых сортов персика в культуре *in vitro*.

Разработаны отдельные этапы оздоровления и микроразмножения персика *in vitro*.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штиинца, 1985. – 311 с.
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. Елманова Т.С., Опанасенко Н.Е. Эколого-физиологические особенности персика. – К.: Аграрна наука, 2010. – 152 с.
5. Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* / О.В.Митрофанова, И.В.Митрофанова, В.Н.Ежов, Н.П.Лесникова-Седошенко, Л.А.Лукичева, А.В.Смыков, В.В.Сенин, Т.В.Литвинова // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91. – С. 111–120.
6. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроразмножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 232 с.
7. Лесникова Н.П., Смыков А.В., Горина В.М. Культура зародышей и получение гибридных форм персика, абрикоса и алычи // Тр. Никит. ботан. сада – Ялта, 1997. – Т. 119. – С. 46–63.
8. Митрофанова О.В., Тесленко А.В. Диагностика вирусных болезней персика в Крыму // Вредители и болезни плодовых и декоративных культур Крыма: Сб. научн. тр. ГНБС. – 1982. – Т. 87. – С. 89–99.
9. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417–421.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.