

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СИСТЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОЗДОРОВЛЕННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА КОСТОЧКОВЫХ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ*

Коваленко Н.Н., д-р биол. наук, Подорожный В.Н., канд. с.-х. наук

Крымская опытно-селекционная станция – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (Крымск)

Реферат. В результате проделанной работы усовершенствована и внедрена на Крымской ОСС филиале ВИР система производства оздоровленного посадочного материала косточковых плодовых культур высших категорий качества. Предложен критерий оценки успешности термотерапии растений – процент свободных от вирусной инфекции инициальных эксплантов для культуры ткани. Определены оптимальные параметры физических условий культивирования растительного материала в термокамере.

Ключевые слова: косточковые культуры, термотерапия, культура апексов, клональное микроразмножение, оздоровленный посадочный материал

Summary. As a result of the work done, the system of production of improved planting material of stone fruit crops of the highest quality categories has been improved and introduced in the Crimean Krymsk EBS, VIR Branch. A criterion for evaluating the success of plant thermotherapy is proposed – the percentage of virus-free initial explants for tissue culture. The optimal parameters of the physical conditions of plant material cultivation in the heat chamber are defined.

Key words: stone fruit crops, thermotherapy, apex culture, clonal micropropagation, virus free planting material

Введение. Развитие современного садоводства предусматривает повышение продуктивности насаждений и снижение себестоимости продукции путем внедрения прецизионных технологий производства. Они неразрывно связаны с использованием в качестве основного элемента новых высокоадаптивных, технологичных и оздоровленных сортов. Сегодня остро стоит проблема создания в короткие сроки безвирусных маточников перспективных сортов садовых культур на конкретных территориях с учетом региональных особенностей. Для оздоровления от вредоносной внутренней инфекции растений в мире чаще всего используют термотерапию в сочетании с культурой изолированных апексов и последующим клональным микроразмножением на искусственных питательных средах [1-10].

Частичная методика суховоздушной термотерапии с последующим культивированием изолированных меристем для многих садовых растений *in vitro* в целом разработана [2, 3, 6, 11]. Но, несмотря на это и имеющиеся более полные методические разработки во ВСТИСП [10], во ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина [7] и др. на практике воспроизводимость результатов низкая, и требуется отработка всех этапов системы оздоровления и размножения с учётом конкретных культур и зональности производства.

Решению этой проблемы посвящена данная работа, которая основана на применении относительно новых биотехнологических приемов. Преимуществом этих приемов являет-

* Работа выполнена с использованием коллекций генетических ресурсов растений ВИР (VIR Collections of Plant Genetic Resources) в рамках государственного задания ВИР (бюджетный проект № 0662-2019-0004)

ся возможность получения оздоровленного посадочного материала в лабораторных условиях с последующим быстрым размножением исходных единичных растений способом клонального микроразмножения, который практически исключает повторное заражение культивируемого *in vitro* растения. Полученные сортообразцы используются для закладки промышленных маточных насаждений и в дальнейшем для производства на их основе саженцев высших категорий качества.

Объекты и методы исследований. Исследования проводились в лаборатории биотехнологии и биохимии Крымской ОСС – филиала ВИР с 1989 по 2018 год с различными сортами косточковых культур: алычи, сливы домашней, черешни, вишни и клоновых подвоев для них (ВСЛ 1, ВСЛ 2, ВВА 1, ВСВ 1, ЛЦ 52). За основу в работе по термотерапии и размножению *in vitro* в культуре ткани взяты методические рекомендации В.И. Кашина, А.А. Борисовой, Ю.Н. Приходько и др. [11], Е.Н. Джигадло [3] и Н.И. Медведевой, В.Н. Подорожного, Н.Н. Коваленко [5].

Идентификация вирусов и тестирование растений на их наличие проводились в соответствии с общепринятыми методиками ПЦР анализа [9, 11]. Для экспресс анализа шарки сливы (PPV) использовали методику, разработанную швейцарской фирмой «AgriStrip» [12]. При математической обработке экспериментального материала применялся метод дисперсионного анализа [4].

В связи с отсутствием промышленных устройств для суховоздушной терапии садовых культур нами разработана, а затем смонтирована в лаборатории биотехнологии оригинальная универсальная камера, которая использовалась в работе как для культивирования в ней целого растения, так и его побегов [8].

Обсуждение результатов. В процессе исследований нами обследованы насаждения косточковых плодовых культур в хозяйствах различных форм собственности Краснодарского края. В результате идентифицировано более 35 возбудителей различных болезней. Наибольшую проблему по вредоносности и площади распространения в крае представляют вирусные заболевания косточковых культур. Из их числа наиболее распространены в коллекционных и промышленных садах: некротическая кольцевая пятнистость (НКП), хлоротическая кольцевая пятнистость (ХКП), хлоротическая пятнистость листьев яблони (ХПЛЯ), шарка сливы (PPV) (табл.).

Результаты диагностики исходных и оздоровленных растений на наличие вирусной инфекции в коллекционном саду Крымской ОСС – филиала ВИР, 2015-2016 гг.

Сорт, подвой	Наличие вирусной инфекции у растений							
	исходных				оздоровленных			
	НКП	ХПЛЯ	ХКП	PPV	НКП	ХПЛЯ	ХКП	PPV
Кубанская комета	+	+	+	+	-	-	-	-
Кремень	-	+	-	-	-	-	-	-
Путешественница	-	+	-	-	-	-	-	-
ВВА 1	+	+	-	-	-	-	-	-
ВСЛ 2	-	+	-	-	-	-	-	-
ЛЦ 52	-	+	+	-	-	-	-	-

Наиболее вредоносным и карантинным заболеванием является шарка (оспа) сливы (PPV), вызываемое потивирусом (Plum pox rotavirus). Он представляет собой частицы нитевидной формы длиной 720-800 nm и содержит одноцепочную РНК. Температура его инактивации, по данным Т.Д. Вердеревской [1], от +50 °С до +60 °С. Таким образом, являясь наиболее вредоносным, термостойким и самым распространённым в старых товарных насаждениях Краснодарского края заболеванием, оно выбрано нами в качестве модельного объекта в ходе всей работы по оздоровлению косточковых плодовых культур.

Усовершенствованная методика получения оздоровленного посадочного материала (M_0) косточковых плодовых культур и их подвоев состоит из следующих элементов: отбор исходного визуально здорового растения → предварительное тестирование на наличие вирусного заболевания → суховоздушная термотерапия отобранных образцов → культура апексов → отбор свободных от вируса регенерантов с последующим массовым получением оздоровленных клонов с использованием клонального микроразмножения → доращивание и хранение «базисных» растений в изолируемых условиях с их регулярным ретестированием (рис.).

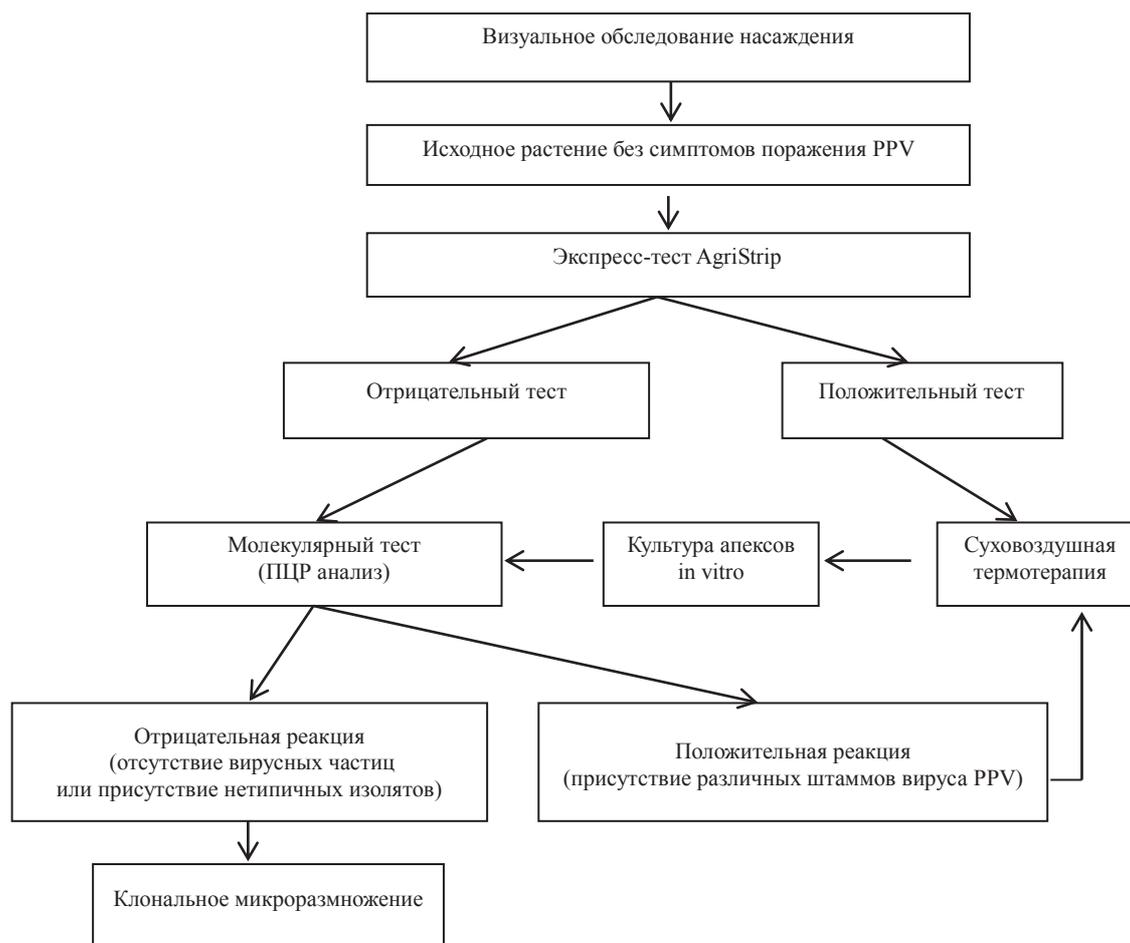


Рис. Схема получения оздоровленных от PPV вируса растений косточковых культур на Крымской ОСС – филиале ВИР

Визуально выделенные экспресс-анализом растения в качестве здоровых необходимо тестировать на наличие вирусов. Для этих целей оптимально пользоваться стрипполосками «AgriStrip» от компании «Биореба», в основе этого способа лежит модифицированный ИФА тест. В случае положительного результата тестирования растительный материал перепроверяется молекулярным тестом (ПЦР-анализ) и только после отрицательного теста напрямую направляется в лабораторию биотехнологии для микроклонального размножения. В дальнейшем проводится выборочное тестирование образцов на этапе пролиферации. Если получается отрицательный результат, то в дальнейшем полученные клоны считаются оздоровленными, и им присваивается категория «базисные». В случае положительного результата тестирования конкретного растения оно исключается из процесса получения безвирусного посадочного материала.

При отсутствии в посадках здорового исходного растения определенного сорта или подвоя зараженный материал готовится к процессу суховоздушной термотерапии, отобранные образцы рекомендуем использовать двумя способами: прививать (способом окулировки) на безвирусные клоновые подвои (либо на подвои толерантные к данному вирусу) и высаживать в небольшие горшки с обеззараженным питательным субстратом; нарезанные на черенки однолетние побеги выставлять в стаканы, опуская их базальными частями в водные растворы питательных веществ.

В первом случае привитые растения после начала роста побега, а во втором черенки сразу помещали в термокамеру для проведения термотерапии. Для этих целей целесообразно использовать разработанное нами [8] и запатентованное ВИРом устройство. В течение следующих 15-50 дней термообработки отрастали побеги, из них затем вычленили верхушечные меристемы для ввода в культуру.

Наряду с динамикой и суммарным приростом побега растений, подвергшихся в ходе работы все эксперименты были направлены на разработку критериев, определение параметров успешной суховоздушной термотерапии как целых растений, так и их частей (черенков, побегов), и размеров вводимого экспланта. В результате исследований критерием успешности термотерапии изучаемых культур признан процент свободных от вирусной инфекции инициальных эксплантов для ввода в культуру ткани. Он включает в себя: оптимальные параметры физических условий культивирования растительного материала в термокамере, влияющие на активность прироста побега; минимально допустимые параметры прироста побегов в ходе термообработки по каждой культуре; температуры с учетом температурного градиента, влажности воздуха, освещенности и её продолжительности, длительности обработки как для целого растения, так и для его побега; оптимальный размер вводимого в культуру экспланта с определением лимита (min – max) допустимых значений.

суховоздушной термотерапии, важным показателем является термотолерантность. Она обычно выражается в численности пригодных к дальнейшему размножению апикальных верхушек, полученных при термообработке определенного числа побегов исследуемого сорта или подвоя. Соотношение обоих значений в таком случае можно рассматривать как индекс термотолерантности. Чем больше это соотношение, тем менее чувствительным к постоянному температурному воздействию является сорт или подвой. Проведенная оценка термотолерантности изучаемых культур и их сортов показала значительную разницу их устойчивости к температурному воздействию.

Так, например, термотолерантны сорта алычи, среди них наибольшая термотолерантность у сорта алычи Кремень (0,86), значительно ниже – у сортов сливы русской Кубанская комета и Путешественница (0,54; 0,51). Из числа подвоев очень высокой устойчивостью к повышенным температурам обладали подвои ВСЛ 1, ВСЛ 2 (*Prunus fruticosa* Pall. × *P. lannesiana* Carr.) – 0,93-0,88, в сравнении с таковой у ВВА 1 (*P. tomentosa* Thunb. × *P. cerasifera* Ehrh.) – 0,55. Сопоставляя интенсивность роста с динамикой прироста побегов, мы отметили явную корреляцию между ними: чем интенсивнее рост растения определенного сорта, тем он толерантнее к теплу.

Анализ результатов исследования суховоздушной термотерапии изучаемых культур показал, что срок термотерапии целого растения не должен превышать шести недель, а освещенность в 3,5-4,5 тыс. лк/м² в зоне побегов способствует наиболее активному их росту при повышенных температурах (+37...+39 °С) и влажности (от 80 % и более). Повышение температуры в зоне побегов свыше +39...+40 °С в ходе обработки растений вызывало гибель апикальных меристем, в зависимости от термотолерантности сорта, дополнительно (20-50 %), а свыше +41 °С было критическим, за которым следовала гибель большинства верхушек оздоравливаемых побегов. Продолжительность освещения в течение 16-18 часов в сутки наиболее благотворно влияла на рост и развитие растений в термокамере, по сравнению с более длительными экспозициями. Прирост побега в сутки при этой экспозиции был наивысшим вне зависимости от породы и сорта.

Ряд экспериментов, связанных с введением в культуру и клональным микроразмножением, позволил определить нам оптимальные среды для культивирования изучаемых растений. Наиболее универсальной признана среда Мурасиге и Скуга (1962) с модификацией состава по макро- и микроэлементам [5].

В результате проделанной работы по совершенствованию производства оздоровленного посадочного материала косточковых культур на Крымской ОСС – филиале ВИР ежегодно производится свыше пяти тысяч таких саженцев. Технологический эффект – повышение выхода оздоровленного посадочного материала изучаемых культур в лаборатории на 25-30 %. Экономический эффект выражается в дополнительной прибыли в размере 12-19 (в зависимости от породы и сорта) рублей с одного произведенного саженца с увеличением рентабельности всего лабораторного производства на 18,5-20,0 %, что в целом удешевило производство оздоровленного посадочного материала высших категорий качества в 1,5 раза.

Выводы. На основании анализа результатов применения в производстве Крымской ОСС – филиала ВИР усовершенствованной системы получения оздоровленного посадочного материала косточковых плодовых культур с использованием биотехнологических методов можно сделать вывод о целесообразности её внедрения в питомниководческих хозяйствах различных форм собственности на территории Краснодарского края.

Литература

1. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микроплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штиинца, 1985. 311 с.
2. Высоцкий В.А. Использование биотехнологических методов при оздоровлении посадочного материала // Актуальные вопросы теории и практики защиты плодовых и ягодных культур от вредных организмов в условиях многоукладности сельского хозяйства: тез. докл. Всерос. совещ. (3-6 марта 1998 г., Москва, Загорье). М., 1998. С. 74-76.
3. Джигадло Е.Н. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005. 51 с.
4. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): учеб. пособие. М.: Колос, 1979. 416 с.
5. Медведева Н.И., Подорожный В.Н., Коваленко Н.Н. Клональное микроразмножение косточковых плодовых культур и их клоновых подвоев: науч.-метод. рекомендации. Крымск: ФГБНУ Крымская ОСС СКЗНИИСиВ. Крымск, 2014. 23 с.
6. Кухарчик Н.В., Семенов С.Э., Колбанова Е.В. Культура *in vitro* в размножении и оздоровлении плодовых и ягодных растений // Актуальные проблемы освещения достижений науки в промышленном плодоводстве: материалы междунар. науч.-производств. конф. (21-22 августа 2002 г., Самохваловичи). Минск, 2002. С. 107-113.
7. Матушкина О.В., Пронина И.П. Клональное микроразмножение плодовых и ягодных культур и перспективы его использования // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. И.В. Мичурина (1931-2001 гг.): сб. науч. тр. / ТТГУ. Тамбов, 2001. С.103-105.
8. Подорожный В.Н., Коваленко Н.Н., Сибиряткин С.В. Устройство для суховоздушной терапии садовых растений и их черенков // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ ВСТИСП. Т. 48, ч. 2. М., 2017. С. 227-233.
9. Методические подходы к выявлению и идентификации вируса шарки сливы (Plum pox Virus) на разных видах представителей рода *Prunus* / И.В. Митрофанова [и др.] // Сб. науч. тр. ГНБС. Т. 138. Ялта, 2014. С. 137-161.
10. Бунцевич Л. Л., Винтер М. А., Щербаков Н. А. Изучение толерантности сливы к вирусу шарки (ppv) по критерию «приживаемость глазков» в ходе вегетативного размножения *in vivo* [Электронный ресурс] // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2018. № 53(5). С. 82-90. URL: <http://journalkubansad.ru/pdf/18/05/08.pdf>. DOI: 10.30679/2219-5335-2018-5-53-82-90 (дата обращения: 17.09.2019).
11. Технологический процесс получения безвирусного материала: метод. указания / сост.: В.И. Кашин, А.А. Борисова, Ю.Н. Приходько [и др.]. – М.: ВСТИСП, 2001. 58 с.
12. Product Information: AgriStrip. PPV AgriStrip – rapigl assay for the detection of Plum pox virus (PPV). – Bioreba AG, Switzerland, 2014. 4 p.