

ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО Н.П., МИТРОФАНОВА О.В., ГОРИНА В.М.  
Никитский ботанический сад - Национальный научный центр,  
Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, пгт. Никита, e-mail: in\_vitro@ukr.net

## СЕЛЕКЦИЯ *IN VITRO* АБРИКОСА, СЛИВЫ И АЛЫЧИ НА ИММУНИТЕТ К ВИРУСУ ШАРКИ (*PLUM POX VIRUS*)

Среди известных и вредоносных вирусов косточковых плодовых культур одним из самых опасных является *Plum pox virus* (PPV) (род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*), поражающий многие виды рода *Prunus* и распространенный в 38 странах мира [1, 10, 13]. Существующие методы борьбы с вирусом шарки мало эффективны из-за имеющихся активных переносчиков инфекции и естественного распространения в садах. Поэтому устойчивость косточковых плодовых культур к вирусу является одной из важнейших проблем селекции. В связи с этим в Никитском ботаническом саду — Национальном научном центре проводятся поиск и отбор устойчивых и толерантных сортов, а также исследования по созданию иммунных к PPV селекционных форм абрикоса, сливы и алычи с использованием биотехнологических и биохимических методов [4, 6]. Использование культуры органов и тканей в селекции *in vitro* для получения иммунных форм, особенно у представителей рода *Prunus* L., нуждается в детальном изучении.

Цель настоящей работы — выявить особенности культивирования изолированных завязей и зародышей абрикоса, сливы, алычи и разработать биотехнологические приемы получения иммунных гибридных форм к вирусу шарки.

### Материалы и методы

Объектами исследования служили бутоны, завязи, зародыши разных стадий развития толерантных и бессимптомных сортов абрикоса (*Prunus armeniaca* L.): Крымский Амур, Крымский Медунец, Harcot, Stark Early Orange; сливы (*Prunus domestica* L.): Венгерка Юбилейная, Клеймен, Миратория, Монфор и алычи (*Prunus cerasifera* Ehrh.): Аштаракская 2, Румяная Зорька, Салгирская Румяная, отобранные на естественном инфекционном фоне и предварительно протестированные на отсутствие вируса шарки с применением системы Пиротест-ИФА [1, 8].

Получение асептической культуры бутонов и завязей осуществляли, используя 70% раствор этанола ( $C_2H_5OH$ ) с экспозицией 30 с, 1,5–2% раствор гипохлорита натрия ( $NaClO$ ) с экспозицией 6 мин и последующую четырехкратную промывку в стерильной дистиллированной воде. Стерилизацию косточек (эндокарпия) и изолирование зародышей *in vitro* проводили по общепринятой методике [2, 3, 5]. Стадию развития зародыша определяли визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 по методике Поддубной-Арнольди [7]. Для культивирования бутонов, завязей и зародышей были использованы базовые питательные среды Murashige, Skoog (MS) [12], Quoirin, Lepoivre (QL) [14], Монье [11], White [15] в нашей модификации. Работы выполняли в асептических условиях ламинарного бокса Fat-

gan Lf (Чехия). Бутоны, отобранные в период обособления, помещали в условия пробирки, отделяя пыльники, которые переносили в стерильные бюксы и помещали в термостат на 8–10 часов при температуре 25 °С. После расстрескивания пыльников пыльцу наносили на рыльце пестика, а завязь продолжали культивировать.

Пробирки и колбы с эксплантами помещали в культуральную комнату со среднесуточной температурой  $24 \pm 1$  °С, освещенностью 2–3 клк, фото-периодом 16 часов и относительной влажностью воздуха 70%. Культуральные сосуды с зародышами первоначально выставляли в холодильные камеры с низкими положительными температурами ( $5 \pm 1$  °С) и отсутствием освещения на 1,5–3 месяца, а затем переносили в культуральную комнату.

Каждый опыт проводили трижды в 15-кратной повторности.

### Результаты и обсуждение

Первоначально исследования были направлены на подбор родительских пар для скрещивания абрикоса, алычи, сливы с учетом их устойчивости, толерантности и восприимчивости к вирусу шарки. Экспериментально проводилось тестирование донорного растительного материала на вирус шарки с применением комплексной системы диагностики [1].

Как показали исследования, важным фактором культивирования бутонов и завязей абрикоса, алычи и сливы являются питательные среды QL и MS, содержащие регуляторы роста (табл. 1) и борную кислоту ( $H_3BO_3$ ) в ко-

Таблица 1

**Регуляторы роста и их концентрации для индукции развития бутонов, завязей и недоразвитых зародышей абрикоса, алычи и сливы**

Вариант опыта	Питательная среда	Концентрация регуляторов роста, мкМ		
		бутон	завязь	недоразвитый зародыш
Абрикос 4 комбинации скрещивания	QL	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	3,33 мкМ БАП 7,99 мкМ ИУК	—
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК <sub>3</sub> 0,14 мкМ НУК
Алыча 2 комбинации скрещивания	MS	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	3,25 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	-
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК <sub>3</sub> 0,14 мкМ НУК
Слива 2 комбинации скрещивания	MS	0,69 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	0,46 мкМ кинетина 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	-
	Монье	-	-	1,86 мкМ кинетина 1,44 мкМ ГК <sub>3</sub> 0,14 мкМ НУК

личестве 20–25 мг/л, тиамин 1,5 мг/л и сахарозу (60 г/л) и L-глутамин — 1–10 мг/л. Кроме этого, одним из факторов, способствующих успешному культивированию эксплантов, является гибберелловая кислота (ГК<sub>3</sub>) (0,29 мкМ), позволяющая сохранить жизнеспособность завязей алычи, сливы до 1–1,5 мес и абрикоса — до 28 суток. Установлено, что через 7 сут после опыления *in situ* завязи алычи достаточно хорошо развивались на питательной среде MS, содержащей 3,25 мкМ кинетина для алычи и 0,46 мкМ кинетина для сливы, 0,29 мкМ ГК<sub>3</sub> и 60 г/л сахарозы (табл. 1). У некоторых завязей после опыления в условиях *in vitro*, спустя 2–2,5 мес были отмечены аномалии в развитии. При добавлении в питательную среду ГК<sub>3</sub> и кинетина увеличивалась жизнеспособность завязей сливы комбинации скрещивания Венгерка Юбилейная x Клеймен, что способствовало развитию зародыша и проростка (табл. 2, рис.). Субкультивирование эксплантов на свежеприготовленные питательные среды осуществляли через 20 сут. Сформированные зародыши переносили на питательные среды MS, QL, Монье и Уайта для получения проростков (табл. 2). Как известно, способность зародышей к формированию проростков в значительной степени определяется длительностью воздейст-

Таблица 2

**Влияние питательных сред на развитие проростков в культуре завязей и недоразвитых зародышей абрикоса, алычи и сливы**

Вариант опыта	К-во проростков, развившихся на питательных средах, %				
	QL + 3,33 мкМ БАП, 7,99 мкМ ИУК	MS + 3,25 мкМ кинетина, 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	MS + 0,46 мкМ кинетина, 0,29 мкМ ГК <sub>3</sub>	Монье + 1,86 мкМ кинетина, 1,44 мкМ ГК <sub>3</sub> , 0,14 мкМ НУК	Уайта + 1,86 мкМ кинетина, 1,44 мкМ ГК <sub>3</sub> , 0,14 мкМ НУК
	завязь	завязь	завязь	зародыш	зародыш
<i>Абрикос</i> Крымский Амур x Narcot	1,7±0,2	-	-	68,5±1,2	26,4±2,1
Крымский Амур x Stark Early Orange	2,5±0,6	-	-	72,4±1,8	32,8±2,6
Крымский Медунец x Narcot	1,0±0,5	-	-	51,2±2,4	21,5±2,4
Крымский Медунец x Stark Early Orange	1,4±0,4	-	-	55,8±2,6	22,6±2,8
<i>Алыча</i> Салгирская Румяная x Аштаракская 2	-	2,5±0,8	-	50,8±1,9	18,4±1,2
Салгирская Румяная x Румяная Зорька	-	1,8±0,6	-	69,5±3,1	20,5±1,7
<i>Слива</i> Венгерка Юбилейная x Клеймен	-	-	1,0±0,4	5,0±0,8	0
Миратория x Монфор	-	-	0	-	-

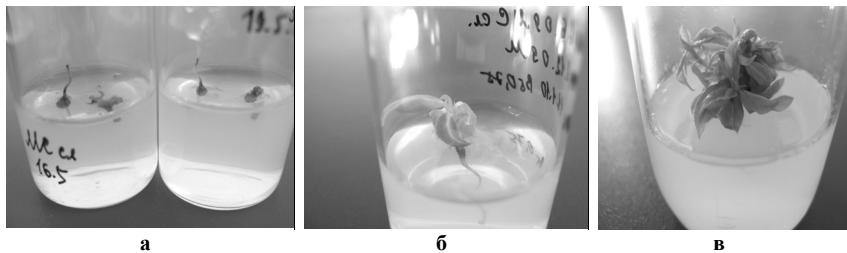


Рис. Развитие завязей (а), проростка (б) и формирование адвентивных микропобегов (в) сливы Венгерка Юбилейная х Клеймен

вия низких положительных температур ( $5 \pm 1$  °С) при отсутствии освещения [2]. Для абрикоса, алычи и сливы период холодовой предобработки зародышей составляет 1,5–3 мес, у ряда комбинаций скрещивания – 3–4 недели. При отсутствии холодовой предобработки в большинстве случаев наблюдали anomальное развитие проростков.

Выявлена зависимость индукции развития завязей и зародышей абрикоса, алычи, сливы от содержания и концентрации в питательной среде регуляторов роста, витаминов, а также от стадии развития зародыша и совместности сортов при скрещивании (табл. 2).

У нормально сформированных зародышей абрикоса Крымский Амур х Нарcot, алычи Салгирская Румяная х Румяная Зорька наблюдали образование полноценных проростков. Несмотря на развитие корней, в ряде случаев у проростков происходило отмирание апикальной части, что характерно при скрещивании абрикоса Крымский Амур х Stark Early Orange (53%), Крымский Медунец х Нарcot (45%) и алычи Салгирская Румяная х Аштаракская 2 (37%). Проростки с отмершей апикальной частью помещали на питательные среды MS, QL и Gamborg, Eveleigh (B5) [9] для индукции развития адвентивных почек из базальной части, что позволило сохранить и размножить полученные гибридные формы.

### Выводы

Таким образом, полученные положительные результаты показывают возможность создания новых гибридных форм абрикоса, сливы, алычи в условиях *in vitro* с участием в скрещивании толерантных сортов и подтверждают перспективность и необходимость продолжения исследований в данном направлении.

Полученные *in vitro* гибридные проростки будут высажены на адаптацию в условия *in vivo* для ретестирования с применением системы Пиротест-ИФА и проверки на искусственном инфекционном фоне с последующим выделением иммунных форм.

*Работа выполнена в рамках проекта НААНУ 09.02/016.*

### Литература

1. Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур / О.В. Мит-

рофанова, И.В. Митрофанова, С.Н. Чирков, В.Н. Ежов, Н.П. Лесникова-Седошенко // Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 2009.— Т.131.— С. 94–103.

2. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro*.— М.: ВАСХНИЛ, 1974.— 60 с.

3. *Здруйковская-Рихтер А.И.* Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений.— Ялта: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003.— 368 с.

4. 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 // Бюлл. Никит. ботан. сада.— 2005.— Вып.91.— С. 111–120.

5. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П.* Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур: Сб. науч. тр. ГНБС.— 1999.— Т.118.— С. 189–200.

6. *Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В.* Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова.— Київ: Логос, 2006.— Т.3.— С. 619–624.

7. *Поддубная-Арнольди В.А.* Исследование зародышей у покрытосеменных растений в живом состоянии // Бюлл. ГБС.— 1952.— Т.14.— С. 3–12.

8. *Чирков С.Н., Приходько Ю.Н.* Пиротест — новый метод диагностики вируса шарки сливы // Промышленное производство оздоровленного посадочного материала плодовых, ягодных и цветочно-декоративных культур: Междунар. науч.-практ. конф.— 20–22 ноября 2001 г.— М.: ВСТИСП, 2001.— С. 71–72.

9. *Gamborg O.L., Eveleigh D.E.* Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem.— 1968.— V.46, N5.— P. 417–421.

10. Molecular identification of *Plum pox virus* isolates from Lithuania and Ukraine / T. Norkus, J. Staniulis, M. Zizyte, M. Melnyk, L. Yusko, H. Snihur, I. Budzanivska, V. Polischuk // Zemdirbyste-Agriculture.— 2008.— Vol.95, N3.— P. 277–285.

11. *Monnier M.* Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastoris* cultives *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution mineral // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie.— 1973.— P. 179–194.

12. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15, N3.— P. 473–497.

13. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease / Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.— 2006.— 36.— P. 202–204.

14. *Quoirin M., Lepoivre P.* Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de Prunus // Acta Hort.— 1977.— Vol.78.— P. 437–442.

15. *White P.R.* Handbook of plant tissue culture.— Jaques Cattel Press, 1943.— Vol.4.— P. 791–794.

## Резюме

Изучение влияния различных факторов культивирования позволило получить гибридные проростки из завязей и зародышей абрикоса, сливы, алычи и разработать биотехнологические приемы создания новых селекционных форм садовых растений.

Вивчення впливу різних факторів культивування дозволило отримати гібридні проростки з зав'язей і зародків абрикоса, сливи, аличі та розробити біотехнологічні прийоми створення нових селекційних форм садових рослин.

The studying of influence of different factors of cultivation allowed to obtain the hybrid germs from ovaries and embryos of apricot, cherry-plum, plum and to work out the biotechnological methods of obtaining new selection forms of horticultural plants.

**МАЛЬЦЕВ Д.И.<sup>1</sup>, ЯМСКОВА В.П.<sup>2</sup>, ИЛЬИНА А.П.<sup>1</sup>, МАРГАСЮК Д.В.<sup>1</sup>, ЯМСКОВ И.А.<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28, e-mail: mal-dima@yandex.ru*

<sup>2</sup>*Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРЕГУЛЯТОРОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТКАНИ ПЕЧЕНИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Впервые биорегуляторы данной группы были обнаружены в печени млекопитающих как адгезивные белки [1]. Впоследствии присутствие этих белков было показано для многих тканей позвоночных животных [2–8]. На основании сходства их физико-химических свойств и характера биологической активности они были выделены в отдельную группу. Активность биорегуляторов характеризуется отсутствием видовой, но проявлением тканевой специфичности [5–9]. Показано, что в основе протекторного действия и ранозаживляющих свойств биорегуляторов лежит их способность активировать клеточные источники регенерации в тканях [5]. Биорегуляторы данной группы представляют собой сложные ассоциаты белков, углеводов, липидов, весьма устойчивые к воздействию ряда физико-химических факторов [4–10]. Важнейшим свойством биорегуляторов является их способность присутствовать в водных растворах в виде частиц размером 100–200 нм и проявлять свою активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих  $10^{-8}$ – $10^{-15}$  мг белка/мл [3].

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование биорегуляторов, выделенных из печени крыс и печени быка. С помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии был изучен состав пептидов, входящих в их состав. На модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* было изучено протекторное действие данных биорегуляторов.

### **Материалы и методы**

Экстракты получали по методике, ранее разработанной для биорегуляторов данной группы [2, 4]. Количественное определение белка в исследуе-