

# **Оздоровление смородины чёрной от сокопереносимых вирусов методом суховоздушной термотерапии в культуре *in vitro***

*Проведена оценка влияния различных режимов термотерапии на жизнеспособность сортов смородины чёрной и оценка эффективности суховоздушной термотерапии *in vitro* в оздоровлении смородины от сокопереносимых вирусов. Установлено, что растения смородины чёрной сортов Катюша, Загадка, Церера более чувствительны к высоким постоянным температурам, чем растения сортов Белорусская сладкая и Памяти Вавилова. Переменные температуры обеспечивали более высокий процент выживания растений. Пробирочные растения с развитой корневой системой не выдерживали термотерапию, более приемлемой является форма пролиферации. Положительный результат в оздоровлении растений смородины чёрной был получен при воздействии высоких постоянных температур.*

**В** оздоровлении посадочного материала от вирусов эффективным является применение суховоздушной термотерапии и различных комбинаций культуры изолированных апексов с термотерапией. Успех термотерапии вегетирующих растений зависит от ряда факторов: степени развития корневой системы растения, ко-

*The estimation of the various regimes of thermotherapy influence on viability of black currant cultivars and estimation of *in-vitro* thermotherapy efficiency in currant sap-transferring viruses elimination was carried out. Shoot cultures of black currant cultivars “Katyusha”, “Zagadka” and “Cerera” appeared to be more sensitive to heat therapy than the plants of “Belarusskaya sladkaya” and “Pamyati Vavilova”. The variable temperatures gave higher percentage of plants’ survival. Plants with well developed root system declined. Cultures in proliferation stage survived. The virus free plants of black currant were received only after high constant temperatures treatment.*

торое ставится в термокамеру, почвенного субстрата и относительной влажности воздуха [1, 3, 17]. Большое значение имеет предварительная акклиматизация растений в камерах с постепенным повышением температуры до желаемой [1, 2, 17]. Термостойкость растений можно повысить путём снижения температуры прикорневой зоны

без нарушения общего режима обеззараживания [3, 5, 11]. Многие авторы отмечают сортовые различия в термостойкости растений [2, 5, 6]. Сами вирусы различаются по способности инактивироваться при термообработке [15]. При обработке термочувствительных вирусов удаётся излечивать растения целиком. Однако чаще от вирусов освобождаются отдельные органы или только верхушки стебля, отросшие во время термообработки. Эти верхушки прививают на безвирусные сеянцы, подвой, укореняют в условиях тумана или выращивают на искусственных питательных средах.

Эксперименты по оздоровлению смородины чёрной показали, что суховоздушная термотерапия при 37-38°C достаточно эффективно освобождает верхушки побегов смородины от сокопереносимых вирусов (экспозиция 22-38 суток). Эффективность оздоровления от этих вирусов повышается при сочетании суховоздушной термотерапии продолжительностью до 38-40 дней с введением в стерильную культуру меристематических апексов величиной менее 0,5 мм и их культивированием не более чем в пяти субкультурах [8, 9, 10, 18].

Перспективным методом оздоровления растений представляется термотерапия *in vitro*, так как даёт возможность лечения большого числа растений в относительно маленьком пространстве и не требует длительного процесса подготовки растений к термотерапии. Термотерапия пробирочных растений с последующим выращиванием верхушек побегов на свежей питательной среде была эффективной в получении безвирусных растений черешни [14], вишни, сливы [4, 12], яблони, груши [13].

Целью нашей работы является оценка влияния различных режимов термотерапии на жизнеспособность сортов смородины чёрной, а также эффективности суховоздушной термотерапии *in vitro* в оздоровлении растений смородины от сокопереносимых вирусов.

## Материалы и методы исследования

Материалом для исследований служили районированные в Беларуси сорта смородины чёрной: Белорусская сладкая, Памяти Вавилова, Катюша, Загадка, Церера, за-

ражённые вирусами кольцевой пятнистости малины (RRV), чёрной кольчатости томата (TBRV), латентной кольцевой пятнистости земляники (SLRV) и огуречной мозаики (CMV). Использовали термокамеру HERAcool-40 фирмы HERAEUS. Инфицированные растения подвергали термотерапии в культуре *in vitro* при постоянных (34, 35, 36°C±1°C) и переменных (34°C днём и 30°C ночью) температурах, освещённости 3,5 тыс. люкс и фотопериоде 16/8. Адаптацию растений к высоким температурам проводили путём ступенчатого (на 2-3°C) повышения температуры в течение недели. Длительность термообработки составила 20 и 28 суток с момента достижения температуры опыта. Для термотерапии использовали 4 варианта агаризованных питательных сред на базе среды Мурасиге и Скуга (MS) (табл. 1).

Изучали 2 типа регенерантов – укоренённые и неукоренённые (фаза пролиферации). Побегов, посаженных на среды 1, 2, 3, 4 (фаза пролиферации), в течение следующих суток были поставлены в термокамеру. Для проведения термотерапии укоренённых регенерантов растения были заранее помещены на среду для укоренения (среда 4) и через 2 недели побегов с хорошо развитой корневой системой высотой более 2 см помещали в термокамеру. После окончания термотерапии из верхушечной части побегов выделяли точку роста (1-5 мм) и выращивали её на среде MS + B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, PP по 0,5 мг/л + C – 1,0 мг/л + мезоинозит – 100 мг/л + сахароза – 30 г/л + 6-БА – 0,1 мг/л; укореняли и адаптировали к нестерильным условиям. Об эффективности метода судили по результатам DAS-ELISA-теста.

Повторность опытов – трехкратная. Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии со схемой двухфакторного дисперсионного анализа по П.Ф. Рокицкому [7].

## Результаты и обсуждение

Исследования показали, что при всех режимах термотерапии у всех сортов через 7-10 дней наблюдается 100%-ная гибель (усыхание) регенерантов с развитой корневой системой. Они оказались значительно более чувствительными к повышенным температурам, что не согласуется с литера-

Таблица 1. Варианты питательных сред, использованные для смородины чёрной в ходе термотерапии *in vitro*

Компоненты	Среда			
	1	2	3	4
	концентрация, мг/л			
Макросоли	по MS	по MS	по MS	S MS
Микросоли	по MS	по MS	по MS	S MS
Хелат железа	по MS	по MS	по MS	по MS
Пиридоксина гидрохлорид (витамин B <sub>6</sub> )	0,5	0,5	0,5	0,5
Тиамина гидрохлорид (витамин B <sub>1</sub> )	0,5	0,5	0,5	0,5
Никотиновая кислота (витамин PP)	0,5	0,5	0,5	0,5
Аскорбиновая кислота (витамин C)	1,0	1,0	1,0	1,0
Мезоинозит	100	100	100	100
6-бензилладенин (6-БА)	0,1	0,3	0,2	-
Индолилмасляная кислота (ИМК)	-	0,1	-	0,4
Гибберелловая кислота (GA <sub>3</sub> )	-	-	1,0	-
Сахароза	30000	30000	30000	20000

турными данными для косточковых культур о лучшем выживании растений с развитой корневой системой [4, 12].

Культивирование при постоянной температуре 34°C в течение 20 суток пяти сортов смородины чёрной в фазу пролиферации показало, что только регенеранты сорта Белорусская сладкая хорошо переносили данный режим термотерапии. Отмечено в среднем на всех средах 61,9% растений данного сорта, пригодных для выделения точки роста и дальнейшего культивирования. Незначительное количество жизнеспособных растений при этом режиме культивирования отмечено и для сорта Памяти Вавилова (1,2%). Регенеранты сортов Катюша, Загадка и Церера полностью погибли в течение 20 суток. При увеличении экспозиции до 28 суток средний показатель выживания растений сорта Белорусская сладкая уменьшился с 61,9 до 26,7%, а растения сорта Памяти Вавилова погибли (табл. 2).

Термотерапии при 35° и 36°C подвергали растения только сорта Белорусская сладкая, как наиболее устойчивого к повышенным температурам. Статистическая обработка выявила достоверное влияние на степень выживания растений *in vitro* только температуры ( $F_{\phi} > F_{0,01}$ ), влияние среды и двух факторов вместе не доказано (табл. 2).

При 35°C процент выживания регенерантов был достоверно ниже, чем при 34°C на всех вариантах питательных сред. Повышение температуры до 36°C привело к 100%-ной гибели регенерантов. Увеличение экспозиции с 20 до 28 суток также снижало выход жизнеспособных

растений, при температуре 34°C – с 61,9% (экспозиция 20 суток) до 26,7% (экспозиция 28 суток), а при температуре 35°C – с 12,5% (экспозиция 20 суток) до 0% (экспозиция 28 суток) (табл. 2).

Наихудшей средой для термотерапии оказалась среда с половинным содержанием макро- и микросолей (среда 4), жизнеспособность побегов на ней в среднем составила 15,0%. Наиболее высокий показатель жизнеспособности пробирочных растений (в среднем 27,5%) зафиксирован на среде MS с добавлением 0,1 мг/л 6-БА (среда 1) (табл. 2).

Таким образом, большинство сортов смородины чёрной оказалось чувствительными к высокой температуре, что совпало с литературными данными, касающимися термотерапии горшечных растений [1, 2].

Переменные температуры (период акклиматизации не проводился) пробирочные растения переносят лучше, чем постоянные (табл. 3).

При оценке эффективности суховоздушной термотерапии *in vitro* против сокопереносимых вирусов на чёрной смородине установлено, что при 34°C экспозиции 20 суток выход здоровых растений от TBRV составил 42,6%, от SLRV – 31,9, от вируса огуречной мозаики – 62,5% (табл. 4).

При увеличении температуры до 35°C выход здоровых растений увеличился. Только одно растение из 9 (11,1%) было заражено TBRV и 4 из 9 (44,4%) остались

**Таблица 2.** Жизнеспособность побегов смородины чёрной сорта Белорусская сладкая в фазу пролиферации при различных режимах термотерапии

Температура, °C (фактор А)	Период термотерапии, сутки	Количество жизнеспособных побегов, %				Средние по фактору А (НСР <sub>05</sub> =9,6)
		питательная среда (фактор В)				
		1	2	3	4	
34	20	76,2±4,8	71,4±8,2	52,4±4,7	47,6±4,7	61,9
	28	27,3±2,8	41,7±8,3	27,3±2,8	9,1±8,3	26,7
35	20	21,4±11,6	7,1±6,6	14,3±7,6	7,1±6,6	12,5
	28	0	0	0	0	0
36	20	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0
Средние по фактору В ( $F_{\phi} < F_{\tau}$ )		27,5	25,9	20,0	15,0	
НСР <sub>05</sub> =16,7 для сравнения частных средних						

**Таблица 3.** Жизнеспособность микропобегов смородины чёрной при термотерапии *in vitro* в режиме переменных температур (среда 1)

Сорт (фактор А)	Количество жизнеспособных побегов, %		Средние по фактору А (НСР <sub>05</sub> =37,0)
	экспозиция, сутки (фактор В)		
	20	28	
Белорусская сладкая	93,3±3,3	86,7±6,7	91,1
Памяти Вавилова	73,3±6,7	53,3±6,7	63,3
Загадка	46,7±6,7	-	46,7
Катюша	40,0±11,5	-	40,0
Средние по фактору В ( $F_{\phi} < F_{\tau}$ )		69,3	70,0
НСР <sub>05</sub> =52,4 для сравнения частных средних			

**Таблица 4.** Влияние суховоздушной термотерапии *in vitro* на оздоровление смородины чёрной от сокопереносимых вирусов (сорт Белорусская сладкая)

Температура, °С	Экспозиция, сутки	Исходная заражённость вирусами	Количество тест-растений	Из них заражено вирусами *							
				TBRV		RRV		SLRV		CMV	
				шт.	%	шт.	%	шт.	%	шт.	%
34	20	TBRV RRV SLRV CMV	16	11	68,8	16	100	11	68,8	6	37,5
		TBRV RRV SLRV	31	16	51,6	31	100	21	67,7	-	-
Общее количество тест-растений			47	27	57,4	47	100	32	68,1	-	-
35	20	TBRV RRV SLRV	9	1	11,1	9	100	4	44,4	-	-

Примечание. \* – растения тестировались через 4-8 месяцев после адаптации в нестерильных условиях

заражены SLRV. Получить растения, свободные от RRV в ходе термотерапии при 34 и 35°C, не удалось (табл. 4).

При переменных температурах положительный результат в оздоровлении растений смородины чёрной не был достигнут. В литературе имеются сообщения о высокой термостабильности сокопереносимых вирусов. Так, термотерапией не удалось элиминировать вирус кольцевой пятнистости малины из растений малины [16]. Как видно из наших результатов, внутри данной группы вирусов, вероятно, существуют различия в термотолерантности.

### Выводы

1. Растения смородины чёрной сортов Катюша, Загадка, Церера очень чувствительны к высоким постоянным температурам. При 34°C они полностью погибали.

2. Сорта Белорусская сладкая и Памяти Вавилова более устойчивы к высоким температурам. Процент выживших растений сорта Белорусская сладкая при 34°C (экспозиции 20 суток) составил 61,9%, Памяти Вавилова – 1,2%. С увеличением продолжительности термотерапии процент выживания пробирочных растений уменьшался.

3. Переменные температуры (34°C днём и 30°C ночью) обеспечивают выживание всех сортов смородины чёрной.

4. Для проведения термотерапии *in vitro* наиболее приемлемой является форма пролиферации.

5. Положительный результат в оздоровлении растений смородины чёрной был получен только при воздействии высоких постоянных температур. Выход здоровых растений сорта Белорусская сладкая при температуре 34°C (экспозиции 20 суток) от CMV составил 62,5%, от TBRV – 42,6, от SLRV – 31,9%; при температуре 35°C (экспозиции 20 суток) было получено 88,9% растений, свободных от TBRV, и 55,6% растений, свободных от SLRV. Получить растения, свободные от RRV, в ходе термотерапии не удалось.

### Литература

1. Клоконос Н.П. Получение безвирусного посадочного материала ягодных культур // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и садоводстве: Сб. науч. тр. / ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 23-25.

2. Кузнецова А.А. Распространение вирусных заболеваний смородины и крыжовника и меры борьбы с ними // Совершенствование защиты плодовых и ягодных растений от вредителей и болезней: Сб. науч. тр. / ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1982. – Вып. 36. – С. 67-74.

3. Литвиненко И.С., Помазков Ю.И. О термическом обеззараживании плодовых растений от вирусов // Вирусы и вирусные болезни растений: Материалы VI Всесоюз. совещ. / Академия наук УССР. Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного. – Киев, 1974. – С. 278-280.

4. Метод термотерапии для получения здоровых плодовых саженцев / Л.Ю. Богущ, А.М. Чернец, И.Н. Бородин и др. // Садоводство, виноградарство и виноделие Молдавии. – 1986. – № 1. – С. 56-57.

5. Помазков Ю.И., Литвиненко И.С., Зленко И.Л. Термическое обеззараживание плодовых растений от вирусов // Плодоводство и ягодоводство нечернозёмной полосы: Сб. науч. тр. / Науч.-исслед. зон. ин-т садоводства нечерноземной полосы. – Москва, 1972. – Т. 4. – С. 363-371.

6. Приходько Ю.Н. Технология оздоровления крыжовника от вирусов // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. тр. / Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – Москва, 1996. – Т. 3. – С. 109-113.

7. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйш. школа, 1973. – 250 с.

8. Суркова О.Ю., Лапинская М.П. Совершенствование технологии получения безвирусных клонов смородины / Актуальные вопросы теории и практики защиты плодовых и ягодных культур от вредных организмов в условиях многоукладности сельского хозяйства: Тез. докл. Всерос. совещ., Москва, 3-6 марта 1998 г. / Рос. акад. с.-х. наук. Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – Москва, 1998. – С. 273-277.

9. Суркова О.Ю., Приходько Ю.Н. Вирусные болезни смородины в европейской части России и совершенствование мер борьбы с ними // Молодые учёные – садоводству России: Тез. докл. Всерос. совещ., Москва, 20-21 июня 1995 г. / Рос. акад. с.-х. наук. Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – Москва, 1995. – С. 150-154.

10. Суркова О.Ю., Приходько Ю.Н. Эффективность различных методов оздоровления смородины от вирузов //

Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. тр. / Всероссий. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. – Москва, 1995. – Т. 2. – С. 193-198.

11. Тулеуов Ж.Т., Гюнтер И.Г. Термотерапия семечковых культур // Защита растений. – 1988. – № 8. – С. 26.

12. Чернец А.М. Получение безвирусных клонов косточковых пород // Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и садоводстве: Сб. науч. тр. / ВНИИ садоводства им. И.В. Мичурина. – Мичуринск, 1989. – С. 21-22.

13. Cieslinska M., Zawadzka B. Preliminary results of investigation on elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy in vitro // *Phytopathol. Pol.* – 1999. – Vol. 17. – P. 41-48.

14. Deogratias J.M., Dosba F., Lutz A. Eradication of prune dwarf virus, prunus necrotic ringspot virus, and apple chlorotic leaf spot virus in sweet cherries by a combination

of chemotherapy, thermotherapy, and in vitro culture // *Can. J. Plant Pathol.* – 1989. – Vol. 11. – № 4. – P. 337-342.

15. Kassanis B.B. Heat therapy of virus-infected plant // *Ann. Appl. Biol.* – 1954. – Vol. 41. – № 3. – P. 470-474.

16. Murrant A.F. Raspberry ringspot and associated diseases of Rubus caused by raspberry ringspot and tomato black ring viruses // Converse R.H., ed. *Virus diseases of small fruits*. United States Department of Agriculture, Agriculture Handbook. – Washington, 1987. – № 631. – P. 211-220.

17. Spiegel S., Frison E.A., Converse R.H. Recent developments in therapy and virus-detection procedures for international movement of clonal plant germ plasm // *Plant Disease.* – 1993. – Vol. 77. – № 12. – P. 1176-1180.

18. Wood G.A. Propagation, virus-screening and heat therapy of northern hemisphere imports of Ribes, Rubus and Vaccinium // *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* – 1989. – Vol. 17. – № 3. – P. 273-274.