ПРОИЗВОДСТВО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА

УДК 634.8. 037: 581.143 6

ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ ОТ ФИТОПЛАЗМ И МИКОПЛАЗМ ПРИ КЛОНАЛЬНОМ МИКРОРАЗМНОЖЕНИИ ВИНОГРАДА

PLANTS' SANITATION FROM PHYTOPLASMA AND MYCOPLASMA IN CLONAL MICROPROPAGATION OF GRAPEVINE

Н.П. Дорошенко, В.Г. Пузырнова

N.P. Doroshenko, V.G. Puzirnova

Всероссийский научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия имени Я.И. Потапенко – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный Ростовский аграрный научный центр»,

Новочеркасск, Россия,

e-mail: ruswine@yandex.ru

All-Russian Research Institute named after Ya.I. Potapenko for Viticulture and Winemaking – Branch of Federal State Budget Scientific Institution «Federal Rostov Agricultural Research Center»,

Novocherkassk, Russia,

e-mail: ruswine@yandex.ru

Аннотация. В статье рассматривается проблема борьбы с фитоплазмами, такими как золотистое пожелтение и почернение коры винограда и патогенами, которые проявляются при культивировании растений *in vitro* и приводят к заражению и гибели пробирочных растений. Осуществлена антибактериальная хемотерапия, основанная на применении антибиотика Цефотаксим. Исследовано действие антибиотика на процесс морфогенеза винограда в культуре *in vitro*. Для того, чтобы элиминировать бактерии, не повреждая растения, Цефотаксим изучен на сортах Красностоп золотовский, Крестовский, Пино нуар, Баклановский, Памяти Кострикина, Кобер 5 ББ, Фиолетовый ранний в концентрациях от 50 до 650 мг/л. Выявлена эффективность отдельных концентраций в зависимости от степени инфицирования растений, которая определялась по реакции растений на антибиотик. У сорта Кобер 5ББ, с высокой степенью инфицирования растений, к концу эксперимента самая высокая сохранность растений в опыте отмечена при концентрациях 300-500 мг/л.

Summary. The paper deals with the problem of phytoplasmas, such as grapevine flavescence doree and black wood and pathogens that appear in the cultivation of plants *in vitro* and lead to infection and death of test-tube plants. Antibacterial chemotherapy based on the use of the antibiotic Cefotaxime was carried out. The effect of the antibiotic on the process of morphogenesis of grapevine in culture *in vitro* was investigated. In order to eliminate the bacteria without damaging the plants, Cefotaxime was studied on varieties: Krasnostop Zolotovskiy, Krestovskiy, Pinot Noir, Baklanovskiy, Pamyati Kostrikina, Kober 5 BB, Fioletoviy Ranniy at concentrations ranging from 50 to 650 mg/l. The effectiveness of some concentrations was revealed. It depended on the degree of plants' infection and by plant response to the antibiotic. Kober 5BB variety, with a high degree of plant infection, by the end of the experiment, showed the highest plant survival at concentrations of 300-500 mg/l. At the

При этом антибиотик не оказал существенного негативного влияния на развитие ризогенной зоны, рост и облиственность растений. При концентрации 100 мг/л отмечено улучшение ростовых процессов. На основании проведенных исследований рекомендуется, при интенсивном заражении растений, использовать антибиотик Цефотаксим в концентрациях 300–500 мг/л для массового микроразмножения растений при производстве оздоровленного посадочного материала и для создания коллекций винограда *in vitro*.

Ключевые слова: фитоплазмы, микоплазмы, химиотерапия, Цефотаксим, концентрации, приживаемость, сохранность, ростовые процессы

DOI: 10.32904/2412-9836-2018-8-44-52

same time, the antibiotic did not have a significant negative impact on the development of the rhizogenic zone, growth and foliage of plants. Concentration of 100 mg/l stimulated growth processes. On the basis of the conducted research it is recommended to use the antibiotic Cefotaxime in concentrations of 300-500 mg/l for the mass micropropagation of plants for production of healthy planting material and to create collections of grapevine *in vitro*

Keywords: phytoplasmas, mycoplasmas, chemotherapy, Cefotaxime, concentrations, survival, preservation, growth processes.

Введение. С каждым годом в мире растет интерес к такой группе возбудителей заболеваний сельскохозяйственных и лесных культур как фитоплазмы. Многие виды этих патогенов относятся к карантинным, как например, возбудитель пожелтения винограда.

Эти возбудители болезней растений наносят большой экономический ущерб сельскому хозяйству. Например, фитопlasма, вызывающая почернение коры винограда, приводит к потерям урожая на юге Европы до 25–30%, а виноградники полностью выкорчёвываются при зараженности в 70%. Такие виды фитоплазм, как возбудитель золотистого пожелтения винограда, уже признаны особо опасными и внесены в карантинные перечни.

Борьба с фитоплазмами затруднена из-за их внутриклеточного паразитизма, а оздоровление зараженных растений и вовсе невозможно. При отсутствии защитных мероприятий в очагах золотистого пожелтения винограда данное заболевание за несколько лет поражает 80–100% растений в пределах одного насаждения.

Борьба с фитоплазменными болезнями включает лечебные и профилактические мероприятия, среди которых на первом месте находится получение и использование здорового посадочного материала [1, 2, 3].

Кроме этого при клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций. Некоторые бактерии, например, из родов *Enterobacter*,

Bacillus являются патогенными исключительно в культуре *in vitro* (*vitro parts*). Бактерии могут вызывать быструю гибель пробирочных растений, снижать их способность к микроклональному размножению и хранению. Иногда контаминация является прямым следствием использования, инфицированного экспланта. Источником контаминации могут явиться компоненты питательных сред. Реальным и достаточно распространенным источником контаминации является внутрелабораторная передача инфекции из воздуха, от персонала, от используемых лабораторных препаратов и от одной культуры клеток к другим.

Бургутиным А.Б. и др.[4] из культуральной среды при введении в культуру изолированных почек черешни и вишни были выделены 32 клона контаминант, проведена их идентификация методом секвенирования фрагмента гена 16SrRNA. Выделенные бактерии представляли собой смесь различных видов и демонстрировали непостоянство биохимических и морфологических свойств. По данным проведенного анализа источниками заражения растений *in vitro* являлись ризосферная, эпифитная и эндофитная микрофлора растений и болезнетворная микрофлора человека. Установлено, что совместное культивирование в одном помещении контаминированных и свободных от микоплазма клеток уже через 1–2 пассажа приводит к инфицированию и последующей гибели.

В таком случае проводят антибактериальную химиотерапию, основанную на применении антибиотиков. Использование антибиотиков основано на их свойстве подавлять развитие патогенной микрофлоры. Кроме того, антибиотики, как и другие микробные метаболиты, могут оказывать непосредственное воздействие на обмен веществ и развитие растений.

С.А. Данилова, Ю.И. Долгих [5], установили видоспецифичный характер стимуляции морфогенеза под действием Цефотаксима. Показано положительное влияние на рост культивируемых тканей и морфогенез у яблони, хлопчатника, у злаковых растений, у твердой пшеницы. Число регенерированных растений увеличивалось под действием антибиотика в 17 раз. Аналогичные результаты были получены и при применении антибиотика в культуре тканей сорго и кукурузы. Таким образом, Цефотаксим, стимулирует морфогенетический процесс и увеличивает частоту регенерации растений, что сокращает период культивирования тканей *in vitro*.

Цефотаксим является полусинтетическим аналогом цефалос-

порина – антибиотика третьего поколения. Цефалоспорины выделяются грибами рода *Cephalosporium*. Основной продуцент этого антибиотика – гриб вида *C. acremonium*. По химическому строению антибиотик принадлежит к группе – лактамных соединений, близких к пенициллинам. Биологическая активность цефотаксима связана с образованием при его разложении стимуляторов роста и морфогенеза.

Цель исследования — разработать способ оздоровления растений винограда от фитоплазм и микоплазм для получения здорового посадочного материала, длительного хранения оздоровленных растений и создания коллекции генофонда винограда *in vitro*.

Объекты и методы исследований. Так как в научной литературе не обнаружено данных о влиянии Цефотаксима на культивируемые *in vitro* растения винограда, в лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ было исследовано действие антибиотика на процесс морфогенеза винограда в культуре *in vitro*. Его недостаток – высокая токсичность. Следовательно, надо подобрать оптимальную концентрацию, чтобы элиминировать бактерии, не повреждая растения.

Цефотаксим в концентрациях 200, 300, 400, 500, 600 мг/л изучен на сортах Красностоп золотовский, Крестовский, Пино нуар, Баклановский и на сорте Памяти Кострикина в концентрациях 50, 150, 250, 350, 450, 550, 650 мг/л. Исследования продолжены в 2017–2018 гг. на сортах Фиолетовый ранний, Кобер 5ББ.

Изучались четыре концентрации антибиотика: 0 мг/л, 100 мг/л, 300 мг/л, 500 мг/л. В качестве эксплантов были взяты микрочеренки со всей длины побегов растений, выращенных *in vitro*. Черенкование проводилось в асептических условиях. Использовалась питательная среда Мурасиге и Скуга, модифицированная П.Я. Голодригой [6]. Антибиотик вносился после автоклавирования в питательную среду, охлажденную до 40–50°C.

Исследования проводились на коллекции *in vitro* растений винограда. Учеты проводились в течение 10 месяцев. Оценивались такие параметры, как гибель растений от инфекции и отсутствия развития с последующим некрозом, приживаемость и сохранность растений, число и длина корней, высота, количество листьев, коэффициент полярности. Статистический анализ данных был выполнен с помощью программы Microsoft Excel.

Обсуждение результатов. Анализ полученных данных показывает, что под действием антибиотика Цефотаксим снижается заражение растений инфекцией, что выражается в улучшении приживае-

мости микрочеренков и регенерации из них растений. При слабом инфицировании растений применение антибиотика улучшает регенерацию на 5,0–15,0 % по сравнению с контролем (Красностоп золотовский, Крестовский). В данном случае эффективны низкие концентрации Цефотаксима: 50–250 мг/л. При заражении от 15,0 до 50,0 % растений (Крестовский, Памяти Кострикина) эффективность применения Цефотаксима возрастает: приживаемость микрочеренков увеличивается по сравнению с контролем на 35,0–45,0%. При этом эффективны концентрации 250–450 мг/л [7].

В первые три месяца наблюдений у сорта Кобер 5 ББ самая низкая – приживаемость была в контроле (21–25%), а самая высокая отмечалась (64–78%) – в варианте с концентрацией антибиотика 100 мг/л. Затем, начиная с четвертого по пятый месяц эксперимента, приживаемость вариантах с концентрацией антибиотика 300–500 мг/л выровнялась и была на уровне 46–57 % (рис.1). В варианте с концентрацией 100 мг/л произошло резкое снижение сохранности растений.

Рис. 1. Приживаемость микрочеренков сорта Кобер 5 ББ при различных концентрациях Цефотаксима

К концу эксперимента самая высокая сохранность растений была зафиксирована в вариантах с концентрациями 300 и 500 мг/л (46%). В контрольном варианте сохранность оставалась низкой на протяжении всего эксперимента (17–25%). Это может быть объяснено зараженностью исходного материала микоплазменной инфекцией.

Приживаемость микрочеренков зависела от гибели их из-за инфекции и отсутствия развития с последующим некрозом тканей

(рис. 2).

Рисунок 2. Приживаемость микрочеренков по вариантам опыта

В течение первого месяца культивирования наблюдалось более высокая гибель от инфекции. Высокая гибель от инфекции в начале культивирования отмечена в контрольном варианте, что указывает на высокую степень заражения исходных маточных растений.

При концентрации Цефотаксима 100 мг/л гибель растений от инфекции, незначительная в начале культивирования —14,3%, во время культивирования увеличилась до 53,6%, что привело к резкому снижению приживаемости. Это можно объяснить тем, что указанная концентрация оказалась неэффективной при таком уровне инфицирования растений фитомикоплазмами.

При концентрациях антибиотика 300 и 500 мг/л во время культивирования отмечено незначительное увеличение гибели растений от инфекции (6,2–7,1%), увеличилась гибель растений из-за отсутствия развития и некроза на 10,7–21,4%. Но несмотря на это, в этих вариантах отмечена самая высокая приживаемость растений –46,4 %. То есть, при высокой степени инфицирования растений сорта Кобер 5ББ эффективно для оздоровления от фитоплазм (микоплазм) применять антибиотик цетофаксим в концентрациях 300–500 мг/л.

В ходе исследования было установлено, что присутствие в среде антибиотика Цефотаксим в концентрации 100–300 мг/л не оказало существенного негативного влияния на развитие ризогенной зоны и высоты растений, а в варианте 100 мг/л даже оказало стимулирующее действие (таб.). Стимулирующее действие Цефотаксима отмечалось и другими исследователями [5].

Таблица Влияние антибиотика Цефотаксим на состояние растений, 2017–2018 гг..

Вариант	Гибель		Приживаемость, %	Корни			Высота, см	Число листьев		Скорость роста, мм/сутки	К. полноты
	ГИ	ОР		число, шт.	длина, см	Ризогенная зона, см		всего	на 1 см побега		
	%	%									
1 месяц											
1	75,0	0,0	25,0	1,3	1,4	1,8	0,6	0,9	1,5	0,2	2,9
2	14,3	7,1	78,6	1,4	4,1	5,7	1,3	1,3	1,0	0,4	4,4
3	17,9	7,1	75,0	1,2	1,2	1,5	0,7	1,1	1,6	0,2	2,1
4	25,0	10,7	64,3	1,3	1,2	1,6	0,9	1,6	1,9	0,3	1,8
5 месяцев											
1	78,6	3,5	17,9	2,2	6,6	14,5	13,7	8,7	0,6	0,9	1,1
2	39,3	10,7	50,0	3,4	9,5	32,3	13,3	8,9	0,7	0,9	2,4
3	25,0	28,6	46,4	4,2	6,8	28,6	13,2	9,8	0,7	0,9	2,2
4	28,6	14,3	57,1	3,3	5,4	17,8	9,6	9,2	1,0	0,6	1,9
10 месяцев											
1	78,6	3,6	17,9	4,2	18,1	76,0	19,3	15,2	0,8	0,7	3,9
2	53,6	28,5	17,9	5,0	23,2	116,0	17,2	21,5	1,3	0,6	6,7
3	25,0	28,6	46,4	3,7	11,4	42,2	16,6	14,4	0,9	0,6	2,5

4	32,1	21,4	46,4	2,7	5,0	13,5	15,2	15,2	1,0	0,6	0,9
---	------	------	------	-----	-----	------	------	------	-----	-----	-----

Стимулирующее действие небольшой концентрации может быть объяснено, взаимодействием двух факторов: во-первых, освобождением от контаминации, во-вторых низкой токсичностью Цефотаксима в этой дозировке. Растения, полученные в варианте с концентрацией Цефотаксима 100 мг/л, возможно использовать как исходные при повторном субкультивировании. Цефотаксим в концентрации 500 мг/л ингибировал ростовые процессы и такие показатели, как: величина ризогенной зоны и высота растений были несколько ниже. Скорость роста растений была самой высокой при концентрации антибиотика 100 мг/л и постепенно снижалась с увеличением концентрации.

Результаты исследований на сорте Фиолетовый ранний отличались следующим образом. Лучшие показатели по приживаемости, величине ризогенной зоны, высоте, скорости роста были в контроле, и снижались по мере увеличения концентрации антибиотика. Это может быть объяснено тем, что исходные растения были инфицированы в меньшей степени, а также, сортоспецифичностью реакции растений, отмечаемой многими исследователями в области микроразмножения винограда [8 – 13].

Таким образом, при сильной степени инфицирования растений антибиотик цефотаксим в концентрациях 300-500 мг/л может быть использован для массового микроразмножения при производстве оздоровленного посадочного материала и для создания коллекций винограда *in vitro*, так как при достаточно высокой сохранности растений наблюдается умеренное снижение ростовых процессов. Результаты исследования будут использованы для разработки протокола введения *in vitro* и хранения в коллекции генофонда растений винограда.

Литература

1. Г.Н. Матяшова, Заец В.Г. Защита растений: исследование метода ПЦР в режиме «реального времени» для обнаружения и идентификации возбудителей фитоплазмозов // Вестник РУДН, серия Агрономия и животноводство, 2015. № 4
2. Богоутдинов Д. З., Кастальева Т. Б., Гирсова Н. В. Фитоплазменные болезни – серьёзная опасность для растениеводства России. DOI 10.25637/TVAN.2018.02.02. Таврический вестник аграрной науки, 2018. № 2 (14)
3. Попкова К.В., Шкаликов В.А., Стройков Ю.М. и др. Общая фитопатология: учебник для вузов – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа, 2005. – 445 с.:
4. Баргутин А.Б., Феоктистов Н.В., Пунина Н.В., Игнатов А.Н., Зотов В.С., Корнев К.П., Матвеева Е.В. Определение видовой принадлежности бактерий контаминиру-

ющих культуру древесных растений *in vitro*. // Тезисы IX Международной конференции: Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология. Звенигород, 2008. С.60.

5. Данилова С.А., Долгих Ю.И. Стимуляция регенерации растений в культуре тканей кукурузы под действием антибиотика цефотаксима // Физиология растений, 2004. Т.51. №4. С. 621–623.

6. Голодрига, П.Я. и др. Методические рекомендации по клональному микро-размножению винограда // Ялта: ВНИИВиПП "Магарач", 1986. 56 с

7. Дорошенко, Н.П. Применение антибиотика Цефотаксим при клональном микро-размножении винограда // Русский виноград, 2015. Т.1. С. 62 – 67.

8. Péros J.-P. Torregrosa L., Berger G. Variability among *Vitis vinifera* cultivars in micropropagation, organogenesis and antibiotic sensitivity // Journal of Experimental Botany, 1998. Vol. 49. Is.319, Pp 171–179, <https://doi.org/10.1093/jxb/49.319.171>

9. Roubelakis-Angelakis K.A., Zivanovic S.B. A New Culture Medium for *in Vitro* Rhizogenesis of Grapevine (*Vitis* spp.) Genotypes. Roubelakis-Angelakis, Hortscience, 1991. 26(12). P. 1551–1553.

10. Micropropagation of Grape Cultivars (*Vitis vinifera* L.) on Different Basal Media Supplemented with Benzyl Adenine / A. Mozafari ; O. Ghoraishi ; H. Ghaderi, T. Gavadi // Agriculturae Conspectus Scientificus, 2017. Vol.81. No.3.

11. Silva R. Luis Z.; Scherwinski-Pereira J. Short-term storage *in vitro* and large-scale propagation of grapevine genotypes [Электронный ресурс // Pesq. agropec. bras. Vol.47 №.3 Brasília Mar. 2012 Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000300005>

12. Celebi Toprak F. Kayhan A.R. *In Vitro* Propagation and Cryopreservation of Important Grape Cultivars (*Vitis Vinifera* L.) and Rootstocks // International Journal of Secondary Metabolite. Vol 1 № 1–2 (2014): Режим доступа: <http://dergipark.gov.tr/ijsm/issue/22526/240712>