

УДК 634.11:631.541.11+632.38]:631.53:581.143.6

ТЕХНОЛОГИЯ ПРОИЗВОДСТВА ОЗДОРОВЛЕННЫХ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ*

С.Э. Семенас, А.А. Змушко, Н.В. Кухарчик

РУП «Институт плодородства»,

ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,

e-mail: Svese7@yahoo.com

РЕЗЮМЕ

В технологии отражены этапы производства оздоровленного посадочного материала подвоев яблони 54-118, 62-396, ПБ-4, включающие в себя отбор и оценку исходных растений, тестирование на наличие вирусов с использованием иммуноферментного анализа (DAS-ELISA-тест), размножение исходных растений в культуре *in vitro* (введение в культуру, питательные среды, микроразмножение, укоренение растений-регенерантов и их адаптация в нестерильных условиях), содержание базовых и маточных растений.

Использование разработанной технологии позволяет получать оздоровленный посадочный материал клонových подвоев яблони, отличающийся высоким качеством и соответствующий современным требованиям: класса «А» категории ССЭ, СЭ, элита и 1-я репродукция; класса «Б» категории элита и 1-я репродукция, а также сохранять и быстро размножить районированные формы подвоев яблони (коэффициент размножения – 15, укоренение – 100 %, адаптация – 74 %).

Ключевые слова: яблоня, клонových подвои, вирусные заболевания, DAS-ELISA-тест, биологическое тестирование, размножение *in vitro*, культура тканей, стерилизация эксплантов, адаптация, базовые и маточные растения, Беларусь.

Схема производства оздоровленного посадочного материала подвоев яблони

1. Отбор по помологическим признакам исходных растений подвоев, включенных в Государственный реестр сортов и древесно-кустарниковых пород Республики Беларусь.

2. Оценка выбранных исходных растений по отсутствию визуальных симптомов заражения всеми группами патогенных организмов (грибные, вирусные, вирусоподобные заболевания и вредители).

3. Тестирование исходных растений на наличие вирусов, вирусоподобных агентов в соответствии со стандартами Республики Беларусь для классов «А» и «Б» [1]. В случае отсутствия таковых заболеваний, присвоение исходным растениям статуса базовое растение (Nuclear stock, супер-суперэлита) (таблица 1).

4. При отсутствии здоровых растений среди исходных растений – освобождение их от патогенов методами культуры *in vitro*, термотерапии, хемотерапии и их комбинирования с обязательным повторным тестированием. В случае отсутствия перечисленных заболеваний при повторном тестировании, присвоение исходным растениям статуса базовое растение (Nuclear stock, супер-суперэлита).

*Рекомендована к публикации Ученым советом РУП «Институт плодородства», протокол № 14 от 24.11.2007.

5. Содержание базовых растений в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса вирусов в закрытом грунте.

6. Повторное тестирование базовых растений – один раз в 5 лет [1].

7. Размножение базовых растений вегетативным способом и получение маточных растений (Propagation stock, суперэлита).

8. Содержание маточных растений в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса вирусов в открытом грунте.

9. Производство вегетативным способом элитного посадочного материала классов «А» и «Б».

10. Производство вегетативным способом посадочного материала 1-й репродукции классов «А» и «Б».

Этапы 1-7 проводят в специализированных лабораториях научно-исследовательских учреждений по плодоводству, этапы 8-9 – в научно-исследовательских учреждениях, базовых питомниках. Производство посадочного материала 1-й репродукции классов «А» и «Б» осуществляют в специализированных питомниках, имеющих соответствующий паспорт.

Таблица 1 – Список вирусов и вирусоподобных патогенов для тестирования яблони для выделения в класс «А» Virus free (V.F) и «Б» Virus tested (V.T.)

Класс А (VF)	Класс Б (VT)
1. ACLSV (вирус хлоротической пятнистости листьев яблони)	1. АрMV (вирус мозаики яблони)
2. АрMV (вирус мозаики яблони)	2. ASGV (вирус бороздчатости древесины)
3. ASGV (вирус бороздчатости древесины)	

ОТБОР И ОЦЕНКА ИСХОДНЫХ РАСТЕНИЙ

Отбор и выделение исходных растений подвоев яблони по помологическим признакам проводится селекционером или помологом.

Визуальная фитосанитарная оценка осуществляется вирусологом методом маршрутных обследований насаждений. Проводят минимум два обследования: в начале и в середине периода вегетации. При этом осматривают каждое растение, отмечая и записывая симптомы и номер растения. Следует обращать внимание на крапчатости, пятнистости, некрозы, на морщинистость или другие аномалии роста листьев, на габитус растения.

Однако у подвоев яблони вирусная инфекция может быть бессимптомной или симптомы могут быть неспецифическими, то есть не позволяющими однозначно сделать вывод о присутствии вируса или диагностировать патоген. Часто симптомы схожи с проявлениями недостатка питательных веществ или с последствиями воздействия пестицидов, поэтому для точного определения инфицированности необходимо проведение тестов. Комплексное заражение более чем одним вирусом усиливает симптомы. Некоторые вирусы в комплексе вызывают различные симптомы, тогда как инфицирование только одним из вирусов бессимптомно. Растения яблони также должны быть свободны от грибных заболеваний и вредителей в соответствии со стандартами на посадочный материал.

Со всех исходных растений, независимо от симптомов, отбирают листья для дальнейшего тестирования методом иммуноферментного анализа (ИФА) или на растениях-индикаторах.

Методом DAS-ELISA-теста (ИФА) определяют наличие/отсутствие следующих сокопереносимых вирусов:

1. Вирус хлоротической пятнистости яблони (Apple chlorotic leafspot virus, ACLSV)

Относится к группе *Trichovirus*. Распространен во всем мире. Большинство сортов бессимптомны, у чувствительных форм симптомы варьируют. Могут наблюдаться:

- прозрачные или хлоротические пятна с асимметричной деформацией листьев (рисунок 1);
- хлоротические кольца и линии неправильной формы на листьях уменьшенного размера, которые часто преждевременно опадают;
- задержка роста дерева;
- отмирание концов побегов;
- внутренний некроз коры и ямчатость ксилемы;
- некроз коры вокруг прививки;
- у чувствительных подвоев – отмирание деревьев.

Симптомы варьируют также в зависимости от сезона. Вирус хлоротической пятнистости яблони переносится с помощью прививки, не распространяется с семенами [2].



Рисунок 1 – Симптомы вируса хлоротической пятнистости яблони на листьях индикаторного растения *Malus platycarpa*.

2. Вирус мозаики яблони (Apple mosaic ilarvirus, ApMV)

Это самый распространенный в мире вирус яблони. У инфицированных растений весной на листьях развиваются белые, кремовые или желтые мозаичные пятна (рисунок 2). Пятна могут быть неправильной формы или образовывать узоры вдоль главных жилок. Летом, в жаркую и солнечную погоду, пятна становятся некротическими, листья могут преждевременно опадать. При высокой температуре воздуха симптомы могут не проявляться. Выраженность симптомов варьирует в зависимости от генома растения, они могут проявляться только на одной ветви, или на всем растении соседствуют нормальные листья и листья с симптомами. Урожайность инфицированных растений может оставаться на уровне здоровых или снижаться до 50 % (в зависимости от генотипа), также может угнетаться рост дерева. Вирус распространяется с помощью прививки и при размножении подвоев, не распространяется семенами, но, вероятно, переносится пылью [3].



Рисунок 2 – Симптомы вируса мозаики яблони на листьях [4].

3. Вирус борозчатости ствола яблони (Apple stem grooving virus, ASGV).

Относится к группе *Capillovirus*. Снижает приживаемость прививок и вызывает угнетение роста деревьев (рисунок 3) [5, 6, 7]. Вирус распространяется с помощью прививки и семенами.

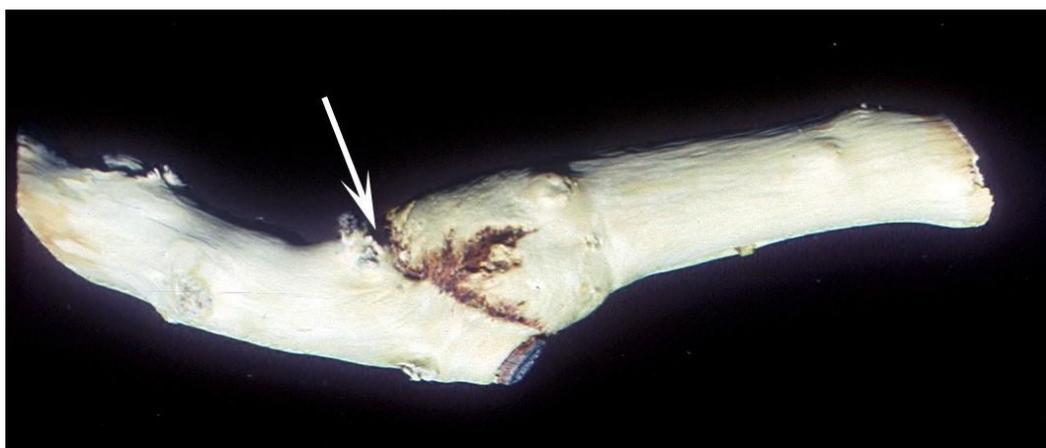


Рисунок 3 – Симптомы поражения вирусом борозчатости ствола яблони в месте прививки [8].

Тестирование исходных растений на наличие/отсутствие сокопереносимых вирусов с использованием иммуноферментного анализа (DAS-ELISA-тест)

Порядок отбора растительного материала:

- проба должна быть собрана с одного растения, обозначенного этикеткой с номером так, чтобы в дальнейшем возможна была индивидуальная идентификация растения. Пробы собираются в день проведения анализа либо за сутки до анализа при условии хранения отобранной пробы в индивидуальном пластиковом пакете при +4...+6 °С (в холодильнике);

- с одного растения отбирают 4-6 листьев с разных сторон средней части побегов. Однако, если на растении видны следы повреждения насекомыми, наблюдаются хлоротические или некротические пятна, деформации листьев, тогда прежде всего следует собрать пробы с поражённых частей растения.

Проведение DAS-ELISA-теста осуществляют согласно рекомендаций производителя наборов для тестирования вирусов. Для каждой микроплаты рассчитывают значение оптической плотности отрицательного и положительного контролей. Результаты тестирования считают достоверными, если оптическая плотность положительного контроля превышает оптическую плотность отрицательного контроля не менее чем в 10 раз. Положительными (т. е. инфицированными) считают образцы, значение оптической плотности которых (A_0) на 100 % и более превышает среднюю оптическую плотность отрицательного контроля (A_k).

Тестирование исходных растений на растениях-индикаторах (биологическое тестирование)

Биологическое тестирование проводят для уточнения результатов ELISA-теста. Маточные индикаторные растения содержат в теплице или открытом грунте. Индикаторные растения прививают на семенные подвой яблони. На этот же подвой прикладывают щиток коры тестируемого растения. Окулировку можно проводить в конце зимы (в условиях климатической комнаты или отапливаемой теплицы), весной или в конце лета. Каждое растение обозначают этикеткой, на которой указывают номер тестируемого растения, индикатор и дату окулировки. Для каждого изучаемого образца проводят тест в трехкратной повторности, контролем служит растение, на которое привит индикатор, но не привит щиток тестируемого растения.

Индикаторные растения культивируют в условиях климатической комнаты, теплицы при температуре, не превышающей 25 °С, или в полевых условиях (в зависимости от индикатора). В защищенном грунте привитые индикаторные растения содержат при температуре +20...+22 °С, освещенности 1000 Лк, влажности 85-90 %. В первые 2 недели после прививки растения постоянно опрыскивают и укрывают полиэтиленовой пленкой.

Осмотр растений-индикаторов проводят регулярно, минимум трех-, четырехкратно в течение вегетации с занесением результатов наблюдений в журнал. Учитывают габитус растения, деформации, изменения цвета и формы листовой пластинки. Длительность культивирования растений зависит от растения-индикатора и тестируемого патогена. В таблице 2 представлена информация по проведению биологического тестирования яблони.

Таблица 2 – Тестирование на содержание вирусов с помощью растений-индикаторов

Название вируса	Индикатор	Место культивирования	Длительность тестирования	Симптомы на индикаторах
ACLSV вирус хлоротической пятнистости листьев яблони	<i>Malus platycarpa</i>	защищенный грунт	20 дней	линейные и кольцевые хлоротические пятна
	<i>Malus pumila</i> R 12740 7A	поле	2 года	хлоротические пятна на листьях и желобчатость ствола, деформация молодых листьев
ArMV вирус мозаики яблони	<i>Malus pumila</i> Lord Lambourne	поле	2 года	мозаичные пятна
	<i>Malus pumila</i> Golden delicious	поле	2 урожая	мозаичные пятна
ASGV вирус бороздчатости древесины	<i>Malus pumila</i> Virginia crab	поле	3 года	желобчатость ствола, ненормальное место прививки
	<i>Malus pumila</i> Virginia crab	защищенный грунт	28 дней	желобчатость ствола, не приживаемость прививки

Размножение исходных растений подвоев яблони в культуре *in vitro*

Общепринятой практикой является закладка маточников саженцами, размноженными *in vitro*. Высокое качество таких маточников оправдывает затраты. Отмечено, что с размноженных в культуре тканей маточных растений получают в 2 раза больше саженцев, причем их качество выше, чем у подвоев, полученных с материнских растений, размноженных традиционными способами. Такая тенденция сохраняется в последующие годы эксплуатации маточника [9, 10]. Кроме того, у яблони наблюдается крайне низкий уровень соматоклональной изменчивости *in vitro* [11, 12, 13, 14, 15], что подтверждает эффективность методики клонального размножения для этой культуры.

Клональное микроразмножение состоит из следующих этапов:

1. Инициация культуры *in vitro* и ее стабилизация. Этот этап включает в себя:
 - выбор маточных растений;
 - поверхностную стерилизацию отобранного растительного материала;
 - вычленение экспланта в стерильных условиях и помещение его на питательную среду в пробирку;
 - культивирование экспланта в климатической комнате со специальным температурным и световым режимом.
2. Размножение *in vitro*, состоящее из одного или нескольких пересадок на свежую питательную среду, сопровождаемых разделением конгломератов растений.
3. Укоренение *in vitro*.
4. Акклиматизация растений к нестерильным условиям в теплице или климатической комнате, затем – в полевых условиях.

Для культивирования подвоев яблони в культуре *in vitro* используют питательные среды на основе макросолей Мурасиге-Скуга, с уменьшенной в 4 раза концентрацией нитрата аммония, дополненные микросолями по Мурасиге-Скугу (таблица 3) и биологически активными веществами, в том числе витаминами и фитогормонами [16].

Таблица 3 – Маточные растворы для приготовления питательной модифицированной среды Мурасиге-Скуга (MS) для культивирования подвоев яблони *in vitro*

Название реактива		Количество вещества в 100 мл маточного раствора, мг	Объем маточного раствора на 1 л среды, мл
Макросоли	Нитрат аммония (NH_4NO_3)	4100	10
	Нитрат калия (KNO_3)	19000	10
	Гептагидрат сульфата магния ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	3700	10
	Дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4)	1700	10
	Дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	4400	10
Хелат железа	Гептагидрат сульфата железа (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	557	5
	Трилон Б ($\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	745	
Микросоли	Тетрагидрат сульфата марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2230	1
	Гептагидрат сульфата цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	860	
	Ортоборная кислота (H_3BO_3)	620	
	Иодид калия (КJ)	83	
	Дигидрат молибдата натрия ($\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	25	
	Пентагидрат сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	2,5	
	Гексагидрат хлорида кобальта ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	2,5	

Для приготовления маточных растворов биологически активных веществ и витаминов растворяют 10 мг данного вещества в 10 мл растворителя. При добавлении маточного раствора в среду нужно добавлять столько миллилитров, сколько миллиграммов должно содержаться в одном литре среды. Все приготовленные маточные растворы хранят в холодильнике, хелат железа – обязательно в емкости из темного стекла.

В среду также добавляют: пиридоксина гидрохлорид (витамин В₆), тиамин гидрохлорид (витамин В₁), никотиновую кислоту (витамин РР) – по 0,5 мг/л, кислоту аскорбиновую (витамин С) – 1 мг/л, мезо- или мио-инозитол – 100 мг/л. Другие биологически активные вещества добавляют согласно таблицы 3. На 1 л среды добавляют 30 г сахарозы, 4,5 г агар-агара. Доводят рН среды до 5,7. На различных этапах микро-размножения добавляют также другие биологически активные вещества.

Стерилизацию сред выполняют в автоклаве при давлении 0,8-1 атм. в течение 15 минут. На этапе размножения растения-регенеранты культивируют в пробирках размером 20×20 мм с объемом питательной среды 7-10 мл, на этапе введения – в пробирках 15×15 мм с 3-5 мл питательной среды.

Организация работ по микро-размножению

Необходимым условием при выполнении работ по микро-размножению является соблюдение строгой стерильности. Инструменты, посуду для введения в культуру

in vitro стерилизуют в течение 2 ч при 140-160 °С. Во время работы в ламинар-боксе инструменты опускают в пробирку с 96%-ным этанолом и обжигают в пламени спиртовки после каждой манипуляции с растительной тканью. Перед началом работы ламинар-бокс протирают этиловым спиртом и облучают ультрафиолетовой лампой в течение 40-60 минут.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5-3 тыс. люкс, температура 21±2 °С, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования – 4-5 недель.

Введение в культуру *in vitro*

Для введения в культуру отбирают здоровые растения (протестированные или визуально здоровые) с доказанной сортовой принадлежностью.

Использование апикальной меристемы в качестве экспланта обеспечивает максимальное количество хорошо развитых растеньиц при минимальной доле инфекции и некроза. Кроме того, такой тип экспланта обеспечивает максимальную генетическую стабильность регенерантов. Эксплант небольшого размера (0,1-0,2 мм) дает возможность оздоровления растений от вирусных и вирусоподобных патогенов в случае, если материнское растение инфицировано.

Инициацию культуры *in vitro* подвоев яблони можно проводить в период активной вегетации (конец мая–июль) или в более поздние сроки, в том числе в период покоя. При инициации культуры *in vitro* в период покоя процент прижившихся эксплантов несколько ниже, чем во время вегетации (15,32 % по сравнению с 23,81 %), но в дальнейшем регенеранты развиваются лучше.

Рекомендуется следующий порядок подготовки эксплантов:

1. В период вегетации черенки заготавливают в день введения в культуру (допускается хранение в течение 1-2 дней в холодильнике при обеспечении высокой влажности, например, в полиэтиленовом пакете), листья удаляют. При инициации культуры в период покоя черенки ставят в сосуд с водой, они могут находиться при комнатной температуре в течение нескольких дней (до недели).

2. Черенки тщательно промывают в проточной воде, затем в растворе моющего средства для посуды, затем вновь проточной водой. Скальпелем отрезают почку с участком коры и древесины так, чтобы длина фрагмента составляла 1-1,5 см. У почек, находящихся в состоянии покоя, удаляют верхние покровные чешуи.

3. Растительный материал помещают в емкость с крышкой и проводят стерилизацию согласно схеме при постоянном встряхивании.

4. Выделяют меристему (0,5-1 мм) с помощью бинокулярного микроскопа при увеличении ×12 и специального набора инструментов.

5. Выделенный эксплант помещают на поверхность питательной среды в пробирке.

Рекомендуемый способ стерилизации:

1. 70%-ный раствор этанола – 20 секунд;
2. 0,1%-ный раствор нитрата серебра в течение 20 минут;
3. Промывка стерильной водой три раза по 15 минут.

Применение этой схемы стерилизации обеспечивает низкий процент инфекции, который сочетается с полным отсутствием некроза, при этом доля нормально развитых эксплантов максимальна.

Питательные среды для инициации культуры *in vitro* подвоев яблони

На этапе инициации культуры *in vitro* используют среду на основе солей Мурасиге-Скуга (таблица 3), с добавлением 1,0 мг/л БА, 0,1 мг/л ИМК, 0,3 мг/л ГА.

При появлении окрашивания среды в коричневый цвет экспланты пересаживают на свежую идентичную среду.

На среде для инициации под воздействием цитокинина (БА) снимается апикальное доминирование и начинается закладка боковых почек. После того как экспланты начнут развиваться (примерно через 3 недели), их пересаживают на среду для микро-размножения, не разделяя конгломерат.

Этап микроразмножения *in vitro*

На этапе собственно микроразмножения *in vitro* продолжается закладка почек, которые дают начало микропобегам. При пересадке на свежую питательную среду микропобеги разделяют, более длинные побеги (свыше 2,5-3 см) разрезают. При пересадке адвентивные побеги удаляют вследствие большого риска появления соматоклональных мутаций в придаточных почках и регенерирующих из них побегов.

На этапе размножения для получения максимального количества хорошо развитых, пригодных для укоренения регенератов яблони рекомендуются следующие среды: подвой 62-396 и ПБ 4 – с добавлением 2 мг/л БА, 0,2 мг/л ИМК и 0,5 ГА; 54-118 – с добавлением 5 мг/л БА, 0,4 мг/л ИМК и 1 мг/л ГК. Использование данных сред позволяет после стабилизации культуры получить коэффициент размножения, равный 15.

Укоренение микропобегов

На среду для укоренения высаживают регенеранты длиной не менее 1,5 см. При укоренении подвоев яблони наблюдается сортовая специфичность по отношению к среде для укоренения.

Подвой 54-118. Для укоренения подвоя 54-118 рекомендуются среды на основе модифицированной MS с добавлением 0,5 или 1,0 мг/л ИМК и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты.

Подвой 62-396. Этот подвой укореняют на среде с полной концентрацией модифицированной среды MS с добавлением 0,5 мг/л ИМК.

Подвой ПБ-4. Для получения укорененных регенерантов подвоя ПБ-4 с максимальным количеством хорошо развитых корней рекомендуется среда с ½ концентрации модифицированной MS с добавлением 1,0 мг/л ИМК и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты, на которой укореняются 100 % микропобегов при максимальной эффективности укоренения (рисунок 4).



Рисунок 4 – Укоренение подвоя ПБ-4 in vitro.

Депонирование пробирочных растений при низких положительных температурах

При длительном культивировании под воздействием цитокининов при многократном пересаживании могут появляться признаки старения культуры: различные функциональные нарушения обменных систем, дыхания, фотосинтеза, ростовых процессов и вегетативного размножения. Поэтому одна из основных задач при необходимости длительного поддержания культуры in vitro – сведение к минимуму числа пассажей и снижение темпов роста и старения культуры. Для того, чтобы избежать пересадки растений, необходимо создать условия, которые, с одной стороны, ограничивали бы рост регенеранта, с другой стороны – обеспечивали высокую сохранность и способность к дальнейшему росту, размножению и укоренению после окончания периода депонирования. Хранящийся материал всегда готов для дальнейшего использования, что позволяет сохранять коллекции в течение длительного времени при относительно низкой стоимости, что значительно сокращает затраты на ежегодное тестирование и оздоровление.

Пробирочные растения подвоев яблони могут храниться до 16 месяцев в условиях бытового холодильника. Возможно хранение как на среде для размножения, так и на среде для укоренения. Перед помещением пробирок на хранение необходимо обмотать пробки лентой из парафина для уменьшения испарения. Затем пробирки помещают в полиэтиленовый пакет (вертикально), который плотно завязывают и помещают в холодильник (без освещения, температура +5...+8 °С).

После окончания хранения регенеранты имеют, как правило, этиолированные побеги длиной от 1 до 10 см (рисунок 5), в некоторых пробирках растения остаются зелеными.

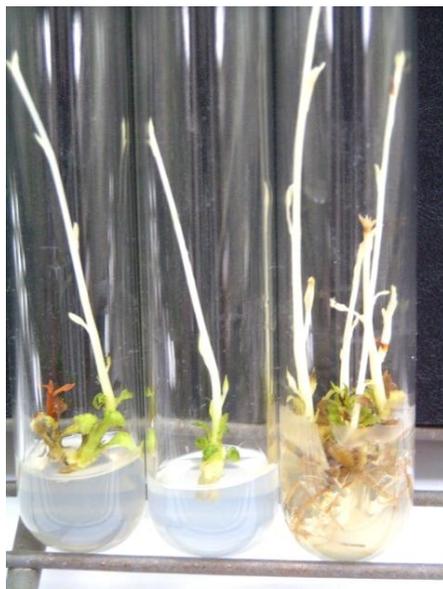


Рисунок 5 – Пробирочные растения подвоя 54-118 после 16 месяцев депонирования в темноте при низких положительных температурах.

После кратковременного (5-10 дней) культивирования в климатической комнате со стандартным режимом растения приобретают нормальную окраску, после чего их пересаживают на свежую питательную среду и в дальнейшем культивируют так же, как регенеранты, не прошедшие период депонирования.

Адаптация регенерантов в нестерильных условиях

При адаптации в нестерильных условиях используют следующие субстраты:

- субстрат, состоящий из смеси торфа торговой марки Флорабел и песка в отношении 3:1 (автоклавирруется в течение 150 минут при давлении 1,5 атм.);
- ионообменный субстрат БИОНА-112;
- смесь Биона-112 и перлита в соотношении 1:2.

Субстраты на основе Бионы и перлита не нуждаются в автоклавировании.

В субстрат высаживают регенеранты с хорошо развитой корневой системой, длиной не менее 0,5 см; корни длиннее 2,5 см укорачивают.

Укорененные регенераты достают из пробирок, корни отмывают от остатков питательной среды в бледно-розовом растворе перманганата калия. Растения высаживают во влажный субстрат в кассеты или ящики и помещают в климатическую комнату. Условия адаптации в климатической комнате: освещение 2,5-3 тыс. люкс, температура 20-22 °С, фотопериод 16/8 часов. Высаженные растения накрывают полиэтиленовой плёнкой, чтобы создать условия 100%-ной влажности. Через 2 недели влажность уменьшают, постепенно открывая, а затем удаляя пленку. Начало нового роста адаптируемых регенерантов свидетельствует о завершении адаптации (рисунок 6). Процент растений, успешно прошедших период адаптации, достигает в среднем 74.



Растения подвоя 54-118
в смеси торфа и песка



Растения подвоя ПБ-4
в субстрате БИОНА-112

Рисунок 6 – Адаптированные растения подвоев яблони.

Адаптированные растения из климатической комнаты высаживают в теплицу в субстрат, состоящий из торфа и песка в соотношении 3:1, или открытый грунт.

Содержание и размножение базовых и маточных растений

Статус базовое растение (Nuclear stock, супер-суперэлита, ССЭ) присваивается исходным растениям, которые не содержат вирусов в соответствии с утвержденным перечнем для класса «А» (таблица 1), которые были выделены в маточных насаждениях открытого грунта или прошли оздоровление в культуре *in vitro*.

Тестирование вирусных заболеваний для подтверждения статуса базовое растение проводят непосредственно перед высадкой адаптированных после размножения в культуре *in vitro* растений. Тестирование достоверно, если температура в месте содержания растений не более 25 °С. Инфицированные растения бракуют.

Базовые растения подвоев яблони содержат:

1. *In vitro* в климатической комнате или при низких положительных температурах в холодильной камере.

2. В защищенном грунте с закрытой корневой системой в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса вирусов, в хорошо проветриваемых теплицах, закрытых от насекомых и клещей специальной сеткой с мелкой ячейкой (Fugafil saran N 400/230). В качестве контейнеров используют пластиковые ящики емкостью 30 л. Субстрат – смесь грунта «Флорабел № 5» и песка (3:1).

3. В открытом грунте в условиях, исключающих реинфицирование воздушными или почвенными векторами переноса вирусов. Схема посадки – 1,40 х 0,3 м (для получения горизонтальных отводков) и 1,40 х 0,10 м (для получения вертикальных отводков). Изоляция от несертифицированных насаждений того же вида должна составлять не менее 300 м.

Получаемый при размножении базовых растений посадочный материал (кроме материала, размноженного в культуре *in vitro*) имеет категорию суперэлиты (маточные растения).

Содержание маточных растений

Маточные растения (суперэлита) класса А – растения, полученные из супер-суперэлиты класса А путем вегетативного размножения и предназначенные для закладки маточных насаждений и выращивания элитного посадочного материала.

Маточные растения подвоев яблони выращивают в открытом грунте. Изоляция от несертифицированных насаждений того же вида должна составлять не менее 300 м. Схема посадки – 1,40 x 0,3 м (для получения горизонтальных отводков) и 1,40 x 0,10 м (для получения вертикальных отводков). Почва контролируется на отсутствие нематод. Мероприятия по защите растений не допускают появления насекомых-вредителей и клещей. В течение вегетационного периода в маточном насаждении проводят стандартные агротехнические мероприятия.

Тестирование вирусных заболеваний в течение срока эксплуатации маточника подвоев яблони проводят 1 раз в 5 лет. Маточные насаждения эксплуатируют в течение 10 лет. После раскорчевки маточника закладка нового маточника яблони на том же участке допускается не ранее чем через 3 года.

Размножение подвоев яблони проводят в соответствии с общепринятыми методиками. Получаемые подвои имеют категорию элиты, их вегетативное потомство – категорию 1-й репродукции.

Система защиты подвоев яблони при выращивании оздоровленного посадочного материала

Система защиты оздоровленных растений подвоев яблони от вредителей и болезней предусматривает непосредственную обработку растений и стерилизацию всех помещений, где выращивают оздоровленные растения. Предусматриваются различные типы обработок для культуральных комнат, теплиц и для открытого грунта.

Культуральные помещения:

1. Ежемесячная обработка культуральных комнат ультрафиолетовым излучением. Аэрозольная дезинфекция культуральных помещений (формалин, 40 % в.р., 2%-ный рабочий раствор).

2. Обработка растений в культуральных комнатах при появлении паутинного клеща (бацитурин, пс., титр 45-60 млрд жизнеспособных спор/г, 1-2%-ная рабочая жидкость; фитоверм, 0,2 % к.э., 0,2%-ный рабочий раствор). Паутинный клещ диагностируется методом визуальных обследований листьев растений с нижней стороны.

3. При появлении комариков-сциарид – вешивание желтых клеевых ловушек (ЖКЛ).

Теплицы:

1. Перед началом работ в теплице (март–апрель) и по их окончанию (октябрь) проводят комплексное обеззараживание путем фумигации серой комовой или серными шашками (50-100 г/м² при условии хорошей герметизации теплиц и при t>18 °С) или опрыскивание конструкций гипохлоридом натрия (10%-ная рабочая жидкость).

2. Обработка растений в защищенном грунте при появлении паутинного клеща (бацитурин, пс., титр 45-60 млрд жизнеспособных спор/г, 1-2%-ная рабочая жидкость; фитоверм, 0,2 % к.э., 0,2%-ный рабочий раствор).

3. При появлении комариков-сциарид – вешивание желтых клеевых ловушек (ЖКЛ).

При появлении первых симптомов болезней: **парша** – строби, 500 г/кг в. г., 0,15-0,2 кг/га; скор, 25 % к. э., 0,15-0,2 л/га, делан, 70 % в. г., 0,5-0,7 л/га; хорус, ВДГ, 0,2 кг/га; эупарен М, СП, 4-8 кг/га; полирам ДФ, 700 г/кг в. д. г., 2,25 кг/га; кумулус ДФ, 800 г/кг в. д. г., 5 кг/га; трайдекс (пеннкоцеб), 80 % с. п., 2 кг/га; **мучнистая роса** – байлетон, СП, 0,15-0,2 кг/га; импакт, 25 % с. к., 0,1-0,15 л/га; топаз, КЭ, 0,3-0,4 л/га; топсин-М, 70 % с. п., 1-2 кг/га; ПСК, 25 % в. р., 2-4 л/га; тиовит джет, ВДГ, 5-8 кг/га).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В технологии отражены этапы производства оздоровленного посадочного материала районированных подвоев яблони (54-118, 62-396, ПБ-4), включающие в себя отбор и оценку исходных растений, тестирование исходных растений на наличие вирусов с использованием иммуноферментного анализа (DAS-ELISA-тест), размножение исходных растений в культуре *in vitro* (введение в стерильную культуру, питательные среды, микроразмножение, укоренение растений-регенерантов и их адаптация в нестерильных условиях), содержание и размножение базовых и маточных растений.

Использование разработанной технологии позволяет получать оздоровленный посадочный материал клоновых подвоев яблони (оздоровление с использованием метода апикальных меристем составляет 50 %), отличающийся высоким качеством и соответствующий современным требованиям, класса «А» категории ССЭ, СЭ, элита и 1-репродукция; класса «Б» категории элита и 1-я репродукция, а также сохранять и быстро размножать районированные формы подвоев яблони (коэффициент размножения – 15, укоренение – 100 %, адаптация – 74 %).

Литература

1. Положение о производстве посадочного материала плодовых и ягодных культур в Республике Беларусь / РУП «Институт плодоводства»; разраб.: В.А. Самусь, Н.В. Кухарчик. – Самохваловичи, 2009. – 35 с.
2. Apple chlorotic leafspot virus / Plant Viruses Online [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr023.htm>. – Date of access: 30.10.2007.
3. Apple mosaic *ilarvirus* / Plant Viruses Online [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr024.htm>. – Date of access: 30.10.2007.
4. Apple mosaic / West Virginia University [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: http://www.caf.wvu.edu/kearneysville/disease_descriptions/omvirus.html. – Date of access: 30.10.2007.
5. Apple stem grooving *capillovirus* / Plant Viruses Online [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://image.fs.uidaho.edu/vide/descr026.htm>. – Date of access: 30.10.2007.
6. Apple stem grooving virus / Washington State University [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://nrsp5.prosser.wsu.edu/nrspgmal.html>. – Date of access: 30.10.2007.
7. Apple stem groovingvirus / International Committee on Taxonomy of Viruses [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/13010001.htm>. – Date of access: 30.10.2007.
8. Apple stem grooving virus / Washington State University [Electronic resource]. – 2007. – Mode of access: <http://www.nrsp5.prosser.wsu.edu/ddp00056.html>. – Date of access: 30.10.2007.
9. Czynczyk, A. Influence of micropropagation on the performance and quality of P22 rootstock in mother plantation / A. Czynczyk, G. Hodun, P. Bielicki // J. Fruit ornamental Plant Res. – 1994. – Vol. 2, № 3. – P. 91-100.

10. Webster, C.A. Micropropagation of the apple rootstocks M9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro* / C.A. Webster, O.P. Jones // J. Hort. Sci. – 1989. – № 64. – P. 421-428.

11. McMeans, O. Assessment of tissue culture-derived “Gala” and “Royal Gala” apples (*Malus x domestica* Borkh.) for somaclonal variation / O. McMeans [et al.] // Euphytica. – 1998. – Vol. 103, № 2. – P. 251-257.

12. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* / В. А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1997. – Т. 13, № 5. – С. 362-371.

13. Кунах, В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 4. Изменчивость в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* / В.А. Кунах // Биополимеры и клетка. – 1998. – Т. 14, № 4. – С. 298-319.

14. Змушко, А. А. Сомаклональная вариабельность в культуре *in vitro* / А.А. Змушко // Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2004. – Т. 16. – С. 289-296.

15. Змушко, А.А. Изучение изменчивости *in vitro* клоновых подвоев яблони, районированных в Республике Беларусь / А.А. Змушко, С.Э. Семенас // От классических методов генетики и селекции к ДНК-технологиям (к 95-летию со дня рождения академика Н. В. Турбина): Междунар. науч. конф., Гомель, 2-5 октября 2007 г. / Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А.В. Кильчевский [и др.]. – С. 34.

16. Самусь, В.А. Методика микроразмножения подвоев яблони *in vitro* / В.А. Самусь [и др.] // Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В.А. Матвеев (гл ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18, ч. 2. – С. 146-156.

PRODUCTION TECHNOLOGY OF HEALTHY APPLE CLONAL ROOTSTOCKS

S.E. Semenas, A.A. Zmushko, N.V. Kukharchik

ABSTRACT

The present technology consists of stages of production of healthy planting material of apple rootstocks and includes selection and estimation of initial plants, DAS-ELISA and biological testing for viruses, *in vitro* propagation of initial plants (culture initiation, nutrition media, micropropagation, rooting of regenerants and adaptation in non-sterile conditions) and maintenance of nuclear stock and mother plants.

The technology allows to obtain healthy planting material of apple clonal rootstocks having high quality, virus-free (super-super-elite, super-elite, elite and 1st reproduction) and virus-tested (elite and 1st reproduction), as well as to maintain and quickly propagate zoned apple rootstocks (propagation rate – 15, rooting rate – 100 %, adaptation rate – 74 %).

Key words: apple tree, clonal rootstocks, viral diseases, DAS-ELISA test, biological test, propagation *in vitro*, tissue culture, sterilization of explants, adaptation, nuclear stock, mother plants, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 31.03.2014