

ОЦЕНКА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* УСТОЙЧИВОСТИ КЛОНОВЫХ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ К БАКТЕРИАЛЬНОМУ ОЖОГУ

Ю. Н. ГОРОВИК¹, А. Л. ЛАГОНЕНКО¹, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹, Н. В. КУХАРЧИК²

¹Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Беларусь,
e-mail: lagonenkoal@mail.ru

²Республиканское унитарное предприятие «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: belhort@it.org.by

АННОТАЦИЯ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» и биологическом факультете БГУ. Объекты исследований: растения-регенеранты клонированных подвоев яблони ПБ-4 и 54-118. Заражение регенерантов клонированных подвоев яблони 54-118 и ПБ-4 в культуре *in vitro* бактериями *Erwinia amylovora* позволило классифицировать растения как устойчивые и средневосприимчивые соответственно. Результаты искусственного заражения культур регенерантов клетками *E. amylovora* показали возможность использования растений *in vitro* для тестирования устойчивости яблони к бактериальному ожогу.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*, ожог плодовых, микроклональное размножение, подвой яблони, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный ожог – это опаснейшее заболевание растений семейства *Rosaceae*, вызванное энтеробактериальным фитопатогеном *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al. (1920). Возбудитель заболевания, изначально описанный лишь в Северной Америке, теперь широко распространен во многих странах, включая Европу. В 2007 г. заболевание было выявлено в Республике Беларусь [1]. Летом 2007 г. была зафиксирована вспышка ожога плодовых в Мядельском и Узденском районах Минской области, а в последующие годы заболевание было выявлено и в других областях. В чистую культуру были выделены несколько штаммов *E. amylovora*, осуществлены их физиолого-биохимическая и молекулярно-биологическая характеристики [2–4].

В связи с тем, что большая часть популярных сортов яблони и груши восприимчива к бактериальному ожогу, болезнь является серьезной проблемой для плодоводства во всем мире. Недавние эпидемии в Западной Европе привели к значительным убыткам и продемонстрировали растущую экономическую значимость адекватного контроля бактериального ожога. Для борьбы с болезнью чаще всего используются медьсодержащие препараты или антибиотики. Однако их применение лимитировано низкой эффективностью, фитотоксичностью или высокой вероятностью возникновения резистентных клеток фитопатогена. Альтернативным способом борьбы с бактериальным ожогом является селекция сортов груши и яблони, устойчивых или толерантных к этому заболеванию. Ранее нами были начаты работы по оценке устойчивости сортов яблони и груши белорусской селекции к бактериальному ожогу методом искусственного заражения вегетирующих растений *ex vitro* [5, 6]. При всем удобстве такого подхода к изучению устойчивости нужно отметить два больших недостатка – искусственное заражение растений яблони и груши, полученных путем зимней прививки, возможно лишь в течение короткого промежутка времени раз в год, а для масштабных экспериментов необходимы климатокамеры соответствующего размера. Микроклональное размножение позволяет быстро получать большое количество растений, причем в течение всего года. Если устойчивость эксплантов к бактериальному ожогу будет соответствовать таковой растений, выращенных в грунте в контролируемых условиях, то искусственное заражение растений, культивируемых *in vitro*, будет прекрасной альтернативой ранее описанным методам оценки устойчивости. Более того, такой подход будет значительно лучше с точки зрения биологической безопасности. В связи с этим, целью данной работы являлась оценка уровня устойчивости к бактериальному ожогу двух модельных клонированных подвоев яблони ПБ-4 и 54-118 в культуре *in vitro* и *ex vitro*.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проведены в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» и биологическом факультете БГУ.

Объекты исследований: растения-регенеранты клоновых подвоев яблони ПБ-4 (свободное опыление Парадизки Будаговского) и 54-118 (Парадизка Будаговского × № 13-14). Оба подвоя включены в Государственный реестр сортов Республики Беларусь.

Для экспериментов по заражению растений яблони в культуре *in vitro* использовали растения-регенеранты, полученные из апикальной меристемы вегетативных почек. За месяц до эксперимента растения-регенеранты клоновых подвоев яблони ПБ-4 и 54-118 пересаживали из пробирок в банки со свежей средой Мурасиге – Скуга, модифицированной для выращивания яблони [7]. В ламинар-боксах растения-регенеранты извлекали из пробирок, удаляли каллус, микропобеги помещали по 5–6 штук в банки со свежей средой. Удаленные каллусы разрезали на мелкие (диаметр 3–4 мм) фрагменты и переносили на свежую среду для регенерации каллусов.

Условия культивирования растений *in vitro*: освещение 2,5–3 тыс. люкс, температура 21–23 °С, фотопериод 16/8 часов. Длительность субкультивирования 4 недели. Растения культивировали в банках объемом 50 мл, с объемом питательной среды 10 мл.

Растения тех же клоновых подвоев, выращенные в открытом грунте, пересаживали в ранневесенний период в индивидуальные контейнеры со смесью грунта «Флорабел-5» и песка в соотношении 3:1. Далее растения с закрытой корневой системой выращивали в течение 40 дней в культуральной комнате при температуре 22 °С, влажности 85 %, освещенности 1000 Лк.

Растения, выращенные *ex vitro* и *in vitro*, заражали клетками штамма *E. amylovora* ЕЗ (выделен из *Malus* sp. в Минской обл., Мядельском р-не, Беларусь, 2007), который показал себя как высоковирулентный в опытах по искусственному заражению яблони [8]. Два верхних, активно растущих молодых листа каждого растения разрезали ножницами, предварительно погруженными в суспензию клеток *E. amylovora* ЕЗ, содержащую 10⁸ кл/мл. Каллусы заражали уколом иглы, смоченной суспензией клеток патогена. Растения, выращенные в грунте накрывали прозрачными целлофановыми пакетами и вместе с растениями, находящимися в банках, инкубировали при +25 °С и 16-часовом освещении. Контролем служили листья, надрезанные стерилизованными ножницами.

Результаты учитывали на 6-е сутки. Интенсивность развития заболевания на растениях оценивали визуально по шкале прогрессии некроза от 0 до 4. Для листьев: 0 – нет симптомов; 1 – некроз в точке инокуляции, затрагивает центральную жилку; 2 – некроз распространяется по центральной жилке и затрагивает черешок; 3 – некроз переходит на стебель; 4 – некроз распространяется на нижние листья. Интенсивность развития заболевания (S) вычисляли по методике [9]. Альтернативный подход к оценке интенсивности развития заболевания заключался в расчете процента некроза относительно общей длины пораженного побега. Классы устойчивости: hR – сильноустойчивый (0–7,0); R – устойчивый (7,1–13,0); mR – среднеустойчивый (13,1–26,0); mS – средневосприимчивый (26,1–60,0); S – восприимчивый (60,1–80,0); hS – сильновосприимчивый (80,1 – 100).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культуры растений *in vitro* имеют широчайшее практическое применение в сельском хозяйстве. Эта техника обеспечивает возможность быстро размножить тысячи здоровых растений на сравнительно малых площадях. Полученные растения могут быть использованы в экспериментах по изучению механизмов взаимодействия с патогеном, разработке методов диагностики и т. д.

Для сравнения устойчивости растений яблони, полученных *ex vitro* и *in vitro*, использовали клоновые подвои яблони ПБ-4 и 54-118. На растениях, выращенных *ex vitro* и *in vitro*, уже на вторые сутки после заражения развивались типичные для бактериального ожога симптомы (рисунок 1). Во многих случаях выделялись капли прозрачного эксудата. В последующие дни становились хорошо заметными некротические повреждения растительной ткани. Интенсивность развития заболевания определяли по четырехбалльной шкале развития некроза и по отношению



Рисунок 1 – Симптомы бактериального ожога плодовых на регенерантах клоновых подвоев яблони: *a* – 54-118; *b* – ПБ-4. На каждом рисунке левое растение – контроль, правое – зараженное

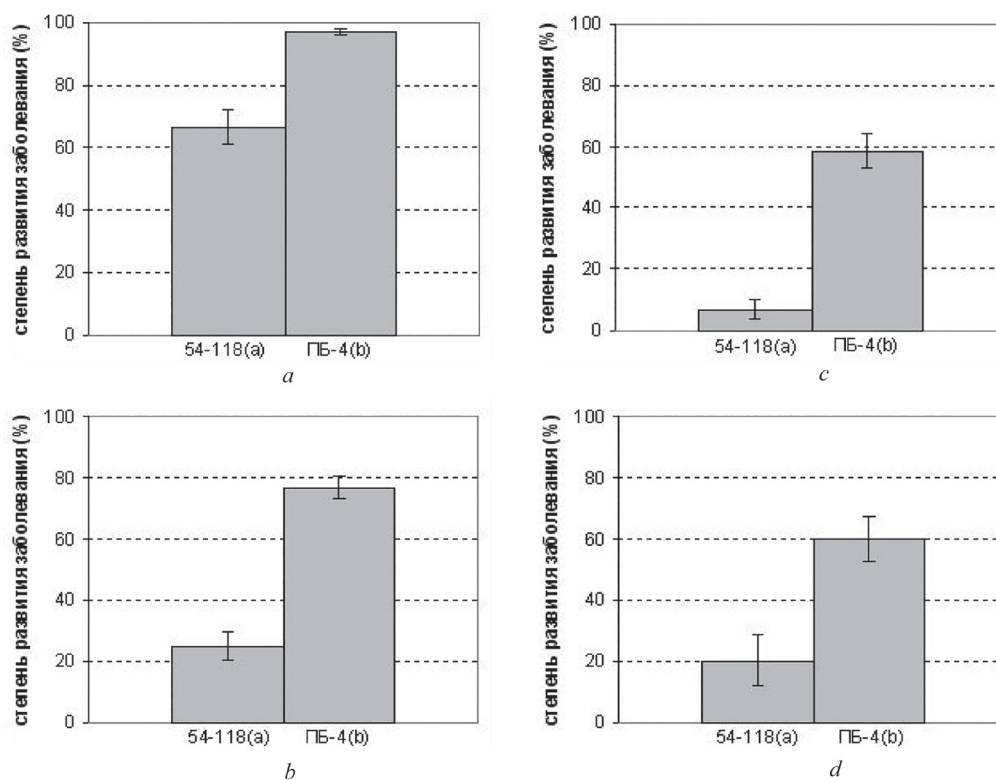


Рисунок 2 – Интенсивность развития бактериального ожога клоновых подвоев яблони 54-118 и ПБ-4. Расчеты проводили: *a* – по четырехбалльной шкале для регенерантов *in vitro*; *b* – по четырехбалльной шкале для растений *ex vitro*; *c* – по отношению длины некроза к общей длине побега для регенерантов *in vitro*; *d* – по отношению длины некроза к общей длине побега для растений *ex vitro*. (*a*) (*b*) – средние значения интенсивности развития заболевания, отмеченные разными буквами, различаются достоверно (Neuman-Keuls test, 5% level of significance)

длины побега, затронутого некрозом, к общей длине побега (рисунок 2). Значения интенсивности заболевания выражали в процентах.

Как видно из представленных данных, клоновые подвои яблони 54-118 и ПБ-4 четко отличаются по уровню устойчивости к бактериальному ожогу плодовых. В результате анализа данных, полученных при искусственном заражении клоновых подвоев яблони, выращенных с закрытой корневой системой, установлено, что наибольшей восприимчивостью к бактериальному ожогу обладает подвой ПБ-4. Интенсивность развития болезни составила 59,9 % (при оценке отношения длины побега, затронутого некрозом, к общей длине побега) и 79 % (по четырехбалльной шкале). На основании этих результатов подвой ПБ-4 был классифицирован нами как средневосприимчивый/восприимчивый к бактериальному ожогу. Значительно слабее поражались растения подвоя 54-118 – 20 и 24 % в зависимости от системы оценки интенсивности развития болезни. На основании полученных данных подвой 54-118 был оценен как среднеустойчивый.

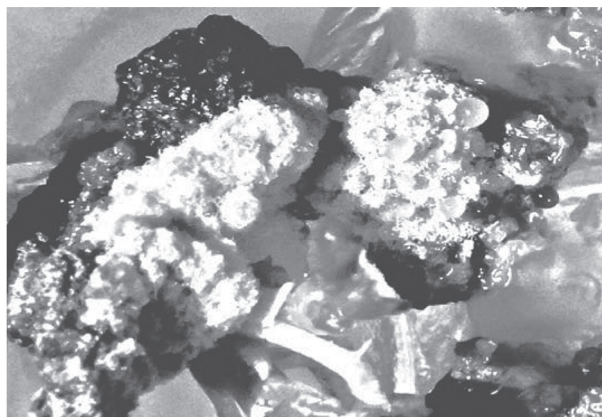


Рисунок 3 – Бактериальный экссудат на каллусе клонового подвоя яблони 54-118 в культуре *in vitro*

При оценке интенсивности развития бактериального ожога на регенерантах *in vitro* по четырехбалльной шкале разница в восприимчивости тестируемых подвоев яблони была не столь выражена – 65 % (54-118) и 98 % (ПБ-4). Такие высокие значения интенсивности, скорее всего, связаны с малыми размерами листьев регенерантов и физиологическими особенностями листьев в культуре *in vitro*. При оценке отношения длины побега, затронутого некрозом, к общей длине побега регенерантов 54-118 и ПБ-4, значения интенсивности болезни составили 8 % (устойчивый) и 69 % (средневосприимчивый) соответственно.

При заражении каллусных культур развивался заметный некроз растительной ткани, в некоторых случаях на поверхности были заметны капли бактериального экссудата (рисунок 3). Однако значимых различий между двумя wybranymi формами клоновых подвоев яблони выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. Заражение растений регенерантов контрастных по устойчивости клоновых подвоев яблони 54-118 и ПБ-4 бактериями *Erwinia amylovora in vitro* показало, что на растениях-регенерантах *in vitro*, как и на растениях, выращенных *ex vitro*, развивались типичные для бактериального ожога симптомы. Результаты заражения растений *ex vitro* сходны с таковыми, полученными на растениях-регенерантах *in vitro*. На основании полученных данных подвой яблони 54-118 может предварительно быть классифицирован как устойчивый, а ПБ-4 как средневосприимчивый. Заражение каллусных культур подвоев не позволило дифференцировать их по устойчивости. Результаты искусственного заражения культур регенерантов клетками *E. amylovora* показали возможность использования растений *in vitro* для тестирования устойчивости яблони к бактериальному ожогу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Eastgate, J. A. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease / J. A. Eastgate // *Molecular Plant Pathology*. – 2000. – Vol. 1, № 6. – P. 325–329.
2. Кудина, И. В. Характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси / И. В. Кудина, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенко // *Тр. Бел. гос. ун-та*. – 2008. – Т. 3. – С. 182–188.
3. First Report of *Erwinia amylovora* Fire Blight in Belarus / A. Lagonenko [et al.] // *Journal of Phytopathology*. – 2008. – Vol. 156, № 10. – P. 638–640.
4. Lagonenko, A. L. Genetic characterization of Belarusian *Erwinia amylovora* strains / A. L. Lagonenko, I. V. Kudzina, A. Evtushenkov // *ISHS Acta Horticulturae*. – 2011. – Vol. 1, № 896. – P. 141–146.

5. Устойчивость белорусских сортов яблони и груши к бактериальному ожогу / А. Л. Лагоненко [и др.] // Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плодоводства; редкол.: В. А. Матвеев (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2008. – Т. 20. – С. 34–39.
6. Susceptibility of belarusian apple and pear cultivars to fire blight / A. L. Lagonenko [et al.] // Acta Horticulturae. – 2011. – № 896. – P. 363–366.
7. Самусь, В. А. Предварительные результаты инициации культуры *in vitro* районированных подвоев яблони / В. А. Самусь, С. Э. Семенас, А. П. Коноплева // Плодоводство: науч. тр. / Ин-т плодоводства НАН Беларуси; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2002. – Т. 14. – С. 22–29.
8. Оценка устойчивости клоновых подвоев яблони к бактериальному ожогу / И. В. Кудина [и др.] // Интенсификация плодоводства Беларуси: традиции, достижения, перспективы: материалы Междунар. науч. конф., пос. Самохваловичи, 1 сент. – 1 окт. 2010 г. / Ин-т плодоводства; редкол.: В. А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2010. – С. 114–115.
9. Лагоненко, А. Л. Методические рекомендации по диагностике и молекулярной дифференциации бактерий *Erwinia amylovora*, возбудителя бактериального ожога плодовых культур / А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенков, Н. В. Кухарчик. – Самохваловичи, 2009. – 24 с.

IN VITRO EVALUATION OF CLONAL ROOTSTOCK RESISTANCE TO FIRE BLIGHT

Y. N. GOROVIK, A. L. LAGONENKO, A. N. EVTUSHENKOV, N. V. KUKHARCHYK

Summary

The study was carried out in the Biotechnology department, the Institute for Fruit Growing and Biological faculty, BSU. The objects were 54-118 and PB-4 clonal rootstock plant regenerants. Infection of regenerants of 54-118 and PB-4 apple clonal rootstocks *in vitro* with *Erwinia amylovora* bacteria allowed to classify plants as resistant and moderately susceptible, respectively. The results of artificial inoculation of *in vitro* cultures by *E. amylovora* indicated the possibility of using *in vitro* plants for testing apple resistance to fire blight.

Keywords: *Erwinia amylovora*, fire blight, micropropagation, apple rootstocks, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 14.05.2018