

ОЗДОРОВЛЕННЯ ВЕГЕТАТИВНИХ ПІДЩЕП АЙВИ

Ооздоровлено вегетативні підщепи рослин айви звичайної А для груші звичайної від вірусу хлоротичної плямистості листків яблуні (ВХПЛЯ) внесенням у живильне середовище Мурашіге-Скуга саліцилової кислоти в культурі *in vitro*. Встановлено лінійну залежність між вмістом саліцилової кислоти і зниженням концентрації ВХПЛЯ в експлантатах підщеп рослин айви звичайної А.

айва звичайна А, груша звичайна, вірус хлоротичної плямистості листків яблуні, живильне середовище, імуноферментний аналіз, саліцилова кислота

Нині одним із пріоритетних наукових напрямів у галузі садівництва є збільшення виробництва плодів і ягід шляхом заміни низкопродуктивних насаджень високопродуктивними. Очікується розробка заходів з оптимізації продукційного процесу, підвищення ступеня плодоношення, рівня агротехніки, захисту від хвороб і шкідників та оновлення наявних сортів плодів культур [5]. Основні шляхи інтенсифікації галузі садівництва передбачають широке використання клонових підщеп рослин з високою пластичністю і пристосованістю до конкретних ґрунтово-кліматичних умов, які були б найпридатнішими для створення скоростиглих насаджень та сумісні з вирощуваними сортами [10]. Проте нагальною проблемою у садівництві залишається ураження садивного матеріалу вірусними, мікоплазмовими, бактеріальними й іншими інфекційними хворобами, що спричиняють втрати продуктивності рослин в розсадниках та садах. Якщо фітопатогенними бактеріями та грибами можна успішно протистояти за допомогою хімічних засобів, то віруси й мікоплазмові інфекції є внутрішньоклітинними паразитами і ця особливість не дає можливості оздоровлювати садові рослини традиційними методами. У випадку ураження вихідної (материнської) рослини інфекціями усі нащадки стають інфікованими хворобами, а це в свою чергу призводить до погіршення якості та бракування розсадницької продукції. З іншого боку, використання уражених

Ю.М. БУНДУК, В.В. ХОМ'ЯК
Українська науково-дослідна станція карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України

І.П. ГРИГОРЮК
Національний університет біоресурсів і природокористування України

саджанців для закладання саду зумовлює зменшення продуктивності рослин на 30—35%, а за дії епіфітотії спричинює їх повну загибель [4]. Саме тому у промисловому садівництві актуальним є застосування технологій отримання безвірусних базових клонів рослин. Згідно з галузевою комплексною програмою розвитку садівництва до 2025 року в Україні передбачено висадити 100% плодів насаджень оздоровленими від вірусних інфекцій [2].

Метою даної роботи була оцінка ступеня оздоровлення інфікованих ВХПЛЯ вегетативних підщеп рослин айви звичайної А для груші звичайної внесенням в живильне середовище Мурашіге-Скуга саліцилової кислоти для культивування мікропагонів.

Методи досліджень. Експерименти проводили в лабораторії біотехнології та селекційного відбору Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України протягом 2011—2012 рр. Для ініціювання культури *in vitro* застосовували апікальні і латеральні бруньки рослин айви звичайної А (*Cidonia oblonga* Mill.). Вихідні експлантати стерилізували за схемою: 70% розчин етилового спирту (5 с), стерильна вода (10 хв), 0,6% розчин сулеми (40 с), стерильна вода (по 10 хв у триразовій повторності). Живильні середовища стерилізували автоклавуванням за температури +120°C і атмосферного тиску 0,1 МПа впродовж 20 хв. На етапі введення в культуру *in vitro* і проліферації використовували живильне середовище Мурашіге-Скуга з додаванням вітамінів в регуляторів росту, рН=5,7.

Рослини айви звичайної А вирощували в умовах культивативної кімнати за умов 16-годинного

фотоперіоду, інтенсивності освітлення 2000—2500 лк, температури 22—25°C і відносної вологості повітря 60—70%. Саліцилову кислоту стерилізували через мембранний фільтр ($d=0,22$ мм) і вносили у живильне середовище після автоклавування. Як вихідний матеріал для хіміотерапії *in vitro* використовували інфіковані ВХПЛЯ рослини. Контрольні варіанти включали живильне середовище Мурашіге-Скуга без внесення СК. Для кожного варіанту досліду використовували по 10 мікропагонів. Порівняльну оцінку впливу різних концентрацій СК на вміст ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А провадили методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тестової системи виробництва ADGEN Phytodiagnosics NEOGEN Europe Ltd (Швейцарія), який забезпечує високу точність і специфічність результату. Метод ІФА впроваджено в практику для виявлення цілої низки фітовірусів в очищених препаратах та стану інфікованих рослин [13].

Для тестування матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експлантата вегетативних підщеп рослин айви звичайної А, яка знаходилася над живильним середовищем. Контрольні, як і експериментальні варіанти, піддавали всім етапам культивування, окрім відсутності в живильному середовищі СК. Дослідження включали ініціацію асептичної культури *in vitro* і розмноження регенованих пагонів рослин айви звичайної А на модифікованому живильному середовищі Мурашіге-Скуга до кількості, яка необхідна для експерименту. Надалі регеновані інфіковані мікропагони рослин, за винятком контролю, перенесли на живильне середовище Мурашіге-Скуга з аналогічним складом, але з внесенням СК у концентраціях 10, 15, 20 і 25 мг/л (варіанти 1, 2, 3, 4). Тривалість пасажу становила 4 тижні, після чого зразки перевіряли на наявність в них ВХПЛЯ методом ІФА.

Ідентичні процедури виконували також на контрольних зразках. Зміни в концентрації вірусу оцінювали як співвідношення різниці між показниками оптичної густини

контрольного інфікованого і експериментального зразків рослин айви звичайної А та оптичної густини першого із зразків:

$$A = OD\ control - OD\ expi / OD\ control,$$

де $OD\ control$ — значення оптичної густини контрольного інфікованого зразка, %; $OD\ expi$ — значення оптичної густини експериментального зразка, %.

Результати досліджень. Клонові підщепи рослин айви звичайної А для груші звичайної за умов інтродукції виявили високу чутливість до інфікування ВХПЛЯ (*Apple chlorotic leaf spot virus*) (ACLSV) [5, 10], який належить до роду *Trichovirus* і родини *Flexiviridae* [19], причому перебуває переважно в латентній формі. Він уражує листки персика, груші, сливи, вишні, абрикоса й інших садових рослин, що належать до родини Розоцвітих (Rosales).

Нами виявлено, що на листках рослин яблуні ВХПЛЯ індукує хлоротичну плямистість, деформацію листових пластинок й появу кільцевих плям в середині дозрілих плодів. Водночас відбувається гальмування приросту листків, які скручуються в трубку, і пагонів рослин яблуні, груші та айви звичайної (рис. 1). На листках багатьох рослин виникають розпливчасті, місцями освітлені ділянки, що згодом набувають форми кілець, порожнин або лінійних візерунків блідо-зеленого чи жовтого забарвлення [18, 20].

ВХПЛЯ являє собою ниткоподібний, звивистий або смугастий капсид з мотузкоподібними частинками завдовжки 680—780 нм і завширшки 12 нм й лінійними сенс-позитивними ssРНК. Вірус може передаватися також за умов механічного зчеплення рослин. Він належить до групи НЕПО-вірусів, відзначається здатністю колонізувати меристематичні клітини та знижувати стимулювальний ефект культури тканин. Експериментально доведено, що ВХПЛЯ складається з РНК розміром 7555 kb нуклеотидів [20], передається від однієї рослини до іншої вегетативно, механічно через клітинний сік, насінням, омелою, нематодами, грибами [3, 8].

Для оздоровлення садових рослин від вірусної інфекції актуальне застосування методу культури тканин у поєднанні з термо- або хімотерапією. Серед значної кількості хімічних сполук ефективни-

ми виявились синтетичні аналоги пуринових і піримідинових основ й рибонуклеази, яким притаманна висока мутагенність [6].

Здатність стимулювати стійкість рослин проти вірусних інфекцій виявлено також у сполук аніонної природи, зокрема полімерів етилену, вінілметилового ефіру, малеїнової, поліакрилової, бензойної, 2-хлоретилфосфорної і ацетилсаліцилової кислот, азацидину та похідних олігоаденілатів [8]. Проте антивірусний ефект наявних препаратів мав здебільшого тимчасовий характер, оскільки через певний час процеси регенерації вірусу в листках рослин відновлювалися.

Дослідженнями показано, що у багатьох рослинах міститься СК — природний фенольний компонент з властивостями фітогормонів, яка бере участь у відповіді рослинного організму на біотичні та абіотичні стреси [9]. Деякі автори СК вважають сигнальною молекулою, яка включає захисні механізми рослин на патогенну інфекцію, регулює реакції з іонами кальцію та пероксиду водню [15]. Заодно вона гальмує процеси синтезу вірусу скручування листків черешні [1], сприяє елімінації Х-вірусу картоплі [18] та нагромадженню стресового гормону абсцизової кислоти в листках рослин [6]. Встановлено, що дія СК на вміст вірусів в листках рослин банана обернено пропорційна їх концентрації в живильному середовищі [11, 12].

В наших експериментах виявлено негативну достовірну кореляцію між кількістю СК у живильному се-



Рис. 1. Симптоми ураження листків рослин айви звичайної А ВХПЛЯ на дослідній ділянці Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України (с. Бояни Новоселицького району Чернівецької області, 2011 р.)

редовищі Мурашіге-Скуга і ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А ($-0,938467$, $p < 0,5$) (табл.). Однак статистичної різниці між ступенем зниження концентрації ВХПЛЯ у варіантах дослідів 1 і 2, 2 й 3, 3 та 4 не виявлено.

Необхідно зазначити, що зниження концентрації ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А відбувалось лінійно і за умов додавання у живильне середовище 10 мг/л СК становило 61,86% (рис. 2). Використання СК у концентрації 15 і 20 мг/л спричинило зменшення рівня ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А на 72,32 та

Середні значення екстинції контрольних (без внесення СК) і експериментальних (з внесенням СК) зразків рослин айви звичайної А, отриманих методом імуноферментного аналізу

Контроль		1	2	3	4
позитивний	негативний				
0,147 ± 0,0625	0,03 ± 0,0025	0,082 ± 0,0154	0,063 ± 0,0097	0,052 ± 0,0152	0,038 ± 0,0057

Примітка: концентрація СК в живильному середовищі Мурашіге-Скуга: 1 — 10 мг/л; 2 — 15 мг/л; 3 — 20 мг/л; 4 — 25 мг/л.

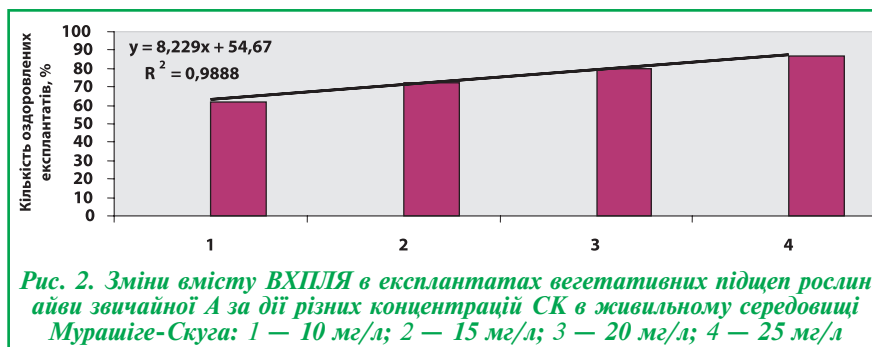


Рис. 2. Зміни вмісту ВХПЛЯ в експлантатах вегетативних підщеп рослин айви звичайної А за дії різних концентрацій СК в живильному середовищі Мурашіге-Скуга: 1 — 10 мг/л; 2 — 15 мг/л; 3 — 20 мг/л; 4 — 25 мг/л

80,09%, а за підвищення її рівня до 25 мг/л — зростання до 86,7%.

Різну реакцію калюсних культур на дію саліцилату і умови культивування (теплота, світло) спостерігали у рослин гречки татарської, що пов'язують з функціонуванням систем антиоксидантного захисту, одним із інтегральних показників якої є вміст перексиду водню у калюсах [7]. Водночас нагромадження певної кількості перексиду водню індукує утворення СК, яка здатна активувати біосинтез PR-білків (*pathogenic related*) різноманітних класів і активних форм кисню й пригнічує активність ферменту каталази в рослинах, що зазнали ураження патогеном або впливу абіотичного стресу [17]. Припускають, що СК може гальмувати фермент оксидазу і таким чином спрямовано регулювати окисно-відновний статус рослинних клітин [14]. Одним із механізмів дії СК є зв'язування ЗСКБ/каталази, що знешкоджує перексид водню, який відіграє роль посередника, наступне підвищення рівня якого діє як сигнал до індукування експресії зв'язаних із захисними реакціями генів, зокрема зв'язаного із патогенезом гена PR-1 [6]. На початковому етапі взаємодії патогена з рослиною спостерігаються інтенсивні відкладання СК на стінках замикальних клітин протидів, а також клітинних стінках мезофільних клітин за умов інтенсивної реакції надчутливості [6].

Наші результати засвідчують, що різні концентрації СК не викликають повної елімінації ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А. Подальше збільшення рівня СК в живильному середовищі до 30 мг/л індукує зменшення інтенсивності процесів росту і розвитку експлантів рослин яблуні [18] та картоплі

[16], а концентрація 40 мг/л — загибель банана [11].

ВИСНОВКИ

Встановлено лінійну залежність між вмістом СК в живильному середовищі Мурашіге-Скуга і ступенем зниження рівня ВХПЛЯ в експлантатах рослин айви звичайної А. Показано, що СК у концентрації 25 мг/л індукує підвищення системної стійкості і зменшення ступеня ураженості ВХПЛЯ експлантів рослин айви звичайної А для груші звичайної на 86,7%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Васильев Р.О. Оздоровлення підщепи Гізела 6 саліциловою кислотою / Р.О. Васильев, Т.В. Медведєва, Н.В. Тряпичина. Вісник аграрної науки. — 2011. — №6. — С. 21—23.
2. Галузева програма розвитку садівництва України на період до 2025 року // www.minagro.gov.ua.
3. Грайгер К. Цветы, декоративные кустарники и деревья в нашем саду. Краткая энциклопедия. Перевод с немецкого В.А. Чекумарев / Карин Грайгер, Ангелина Вебер. — М.: Интербук-бизнес, 1998. — 383 с.
4. Довгань С.В. Фітосанітарний моніторинг 22.01.09 / С.В. Довгань, О.М. Орлова, О.Б. Сядриста. www.golvderg Zahist.com.ua.
5. Кучер Р.А. Обґрунтування підбору маточно-насіньових форм груші для вирощування слаборослих підщеп у Лісо-stepу України / Р.А. Кучер // Автореф. дис. канд. с.-г. наук — Умань, 2005. — 22 с.
6. Лапа О.М. Саліцилова кислота в рослиниці / О.М. Лапа, Р.В. Ковбасенко, В.М. Ковбасенко та ін. — К.: Колобій, 2011. — 76 с.
7. Максютова Н.Н. Влияние салициловой кислоты на белковый состав каллусов гречихи татарской с различной способностью к морфогенезу / Н.Н. Максютова, Е.И. Галеєва, Н.И. Румянцева и др. // Биохимия. — 2005. — 70, вип. 3. — С. 390 — 396.
8. Мельничук М.Д. Фітовірусологія. Навчальний посібник / М.Д. Мельничук. — К.: Поліграфконсалтинг, 2005. — 200 с.
9. Молодченкова О.О. Предполагаемые функции салициловой кислоты в растении / О.О. Молодченкова. Физиология и биохимия культ. растений. — 2001. — 33, №6. — С. 463 — 473.
10. Трохимчук В.А. Агробіологічна оцінка клонових підщеп груші в маточниках і полях / В.А. Трохимчук // Автореф. дис. канд. с.-г. наук. — Умань, 2004. — 19 с.
11. Abdel-Aziz N.A. Heat and chemotherapeutic agent as tool for elimination of two banana viruses / N.A. Abdel-Aziz, A.M. Abdel-Salam, H.N. Soliman // Egypt J. of Phytopath. — 1998. — №26. — P. 420 — 426.
12. Abdel-Salam A.M. Biological, biochemical, serological and tissue cultural studies on an Egyptian isolate of tobacco ringspot virus infected potato plants / A.M. Abdel-Salam, G.A.M. Ghanen, A.M.E. Aly. Arab. // J. Biotech. — 2003. — №6. — P. 154—163.
13. Clark M.F. Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M.F. Clark, A.M. Adams. // J. of Gen. Virology. — 1977. — 34, №2. — P. 475 — 483.

14. Dat S.P. The interplay between salicylic acid and reactive oxygen species during cell death in plants / S.P. Dat, N. Capelli, P. Van Breusfem // Salicylic acid-A Plant Hormone, Springer. — 2007. — P. 247—276.

15. Kawano T. Salicylic acid as a defense — related plant hormone / T. Kawano, T. Furukuchi // Salicylic acid-A Plant Hormone, Springer. — 2007. — P. 277—321.

16. Lopez-Deldago H. Salicylic acid enhances heat tolerance and potato virus X elimination during thermotherapy of potato microplants / H. Lopez-Deldago, M.E. Mora-Herrera, H.A. Zavaleta-Mancera // Americ. J. of Potato Res. — 2004. — №81. — P. 171 — 176.

17. Mur L.A.S. A new partner in the dance macabre: the role of nitric oxide in the hypersensitive response / L.A.S. Mur, I.E. Santonsa, L.S.S. Laarhoven et al. // Buld. J. Plant Physiol. — 2003. — Spec. Issue. — P. 110—123.

18. Rana T. Characterisation of apple chlorotic leaf spot virus infecting almonds in India / T. Rana, V. Chandel, V. Hallon // Austral. Plant Disease Notes. — 2008. — № 3. — P. 65 — 67.

19. Ulubas C. Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques / C. Ulubas, F. Er-tung // Turk. J. Agric. For. — 2005. — №29. — P. 251—257.

20. Yoshikawa N. Analysis of apple chlorotic leaf spot virus / N. Yoshikawa, S. Oogake, M. Terada // Archives of Virology. — 1999. — 144, № 12. — P. 2475—2483.

**Ю.М. Бундук,
В.В. Хомяк,
І.А. Григорюк**

Оздоровление вегетативных подвоев айвы

Проведено оздоровление вегетативных подвоев растений айвы обыкновенной А для груши обыкновенной от вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (ВХПЛЯ) внесением в питательную среду Мурашіге-Скуга саліцилової кислоти в культурі in vitro. Установлена лінійна залежність між содержанием саліцилової кислоти и снижением концентрации ВХПЛЯ в експлантатах подвоев растений айвы обыкновенной А.

айва обыкновенная, груша обыкновенная, вирус хлоротической пятнистости листьев яблони, питательная среда, иммуноферментный анализ, саліциловая кислота

**Yu.M. Bunduk,
V.V. Homyak,
I.A. Hrygoryuk**

Improvement of vegetative quince rootstocks

Improvement of vegetative rootstocks of common quince plants for a common pear from Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) was made by application into the growth nutrient medium of Murashige-Skooga of salicylic acid in culture in vitro. Is established a linear relationship between the content of salicylic acid and decrease of ACLSV concentrations in explants of rootstocks of common quince A plants.

common quince, common pear, apple chlorotic leaf spot virus, nutrient medium, immunoenzyme analysis, salicylic acid

