

УДК 632.5.01./08.

© Г.М. Шевага, Ю.М. Бундук, В.М. Гунчак, М.М. Кирик, 2015

# ЕФЕКТ САЛІЦИЛОВОЇ КИСЛОТИ НА ОЗДОРОВЛЕННЯ РОСЛИН КАРТОПЛІ

*Досліджено вплив саліцилової кислоти (у концентраціях 10, 15, 20, 25 мг/л) на морфометричні показники та процес оздоровлення сортів картоплі методом культури меристеми у поєднанні з хіміотерапією від вірусу скручування листя картоплі.*

**віруси картоплі, апікальні меристеми, хіміотерапія**

Картопля — культура, яка у світовому виробництві продуктів харчування посідає четверте місце після пшениці, рису та кукурудзи [1]. Більшість районуваних сортів картоплі уражені вірусами, які нерівномірно розповсюджуються в рослинах. Так, верхівки пагонів картоплі — меристеми містять безвірусну зону, величина якої змінюється залежно від сорту і ступеня ураженості вихідного матеріалу. Цю особливість покладено в основу методу культури апікальної меристеми, який широко застосовується для оздоровлення картоплі [2]. Відомо, що найбільш ефективним способом одержання вільних від вірусів рослин є культивування експлантів розміром не більше 100 мкм, але приживлюваність таких меристем мінімальна [3].

Дослідники досягли певних успіхів у оздоровленні картоплі шляхом культивування меристем розміром 300—400 мкм. Цей метод можна використати для оздоровлення рослин картоплі від L, Y, A-вірусів, проте він не ефективний для X, M, S-вірусів, які можуть проникати в меристему на різну глибину [4].

Труднощі захисту від вірусних інфекцій зумовлені як особливостями біології рослин, так і особливостями паразитизму вірусів. Вихідним матеріалом для відтворення еліти картоплі на рівні з матеріалом від добору клонів є також матеріал, оздоровлений методами біотехнології, зокрема, культивуванням меристем. Звільнитися від вірусної інфекції лише за використання методу культури меристем не завжди можливо, ефективність оздоровлення підвищують за допомогою

**Г.М. ШЕВАГА,  
Ю.М. БУНДУК,**  
кандидат сільськогосподарських наук

**В.М. ГУНЧАК,**  
кандидат сільськогосподарських наук  
Українська науково-дослідна станція  
карантину рослин ІЗР НААН,  
вул. Наукова, с. Бояни,  
E-mail: h\_shewaha@mail.ru

**М.М. КИРИК,**  
доктор біологічних наук, професор,  
академік НААН  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
вул. Героїв Оборони, 13; м. Київ,  
03041, Україна

додаткових антивірусних заходів, а саме — за допомогою термо- або хіміотерапії. Серед значної кількості хімічних сполук ефективними виявились синтетичні аналоги пуринових та піримідинових основ й рибонуклеази, яким властива висока мутагенність [5—7].

У багатьох рослинах міститься саліцилова кислота (СК) — природній фенольний компонент із властивостями фітогормонів, який бере участь у відповіді рослинного організму на біотичні та абіотичні стреси [8].

В літературі існує багато даних стосовно антивірусної активності саліцилової кислоти. Відомо, що СК — важливий компонент ланцюга реакцій, що ведуть до розвитку місцевого та системного захисту клітин рослин від патогенів різної природи. Доведено, що внутрішньоклітинна концентрація СК підвищується за патогенезу. Рослини, які не здатні збільшувати внутрішньоклітинну концентрацію СК, є більш чутливими до вірусів: продукують більш некрози, полегають розповсюдження вірусу по рослині [9]. У 1979 р. було встановлено, що обробка рослин тютюну СК підвищує їх резистентність до інфекції вірусу тютюнової мозаїки [10].

З того часу з'явилася низка повідомлень про зменшення розміру некрозів під дією СК. Нею обробляють поверхню листка (шляхом натирання або обприскування), роблять ін'єкції, вводять з транспіраційним током через черешок зрізаного листка і, нарешті, рослини поливають розчином СК. В цих роботах [11], як правило, екзогенну СК застосовують за кілька днів до інфікування та реєструють некрози через кілька днів після інюкуляції. Такий пролонгований ефект мав на меті ініціацію низки метаболічних змін — синтез PR-білків (специфічні білки, що призводять до укріплення бар'єрних властивостей мембрани), індукцію синтезу кумаринових фітоалексинів, утворення активних форм кисню. Іншими ефектами СК можуть бути гальмування реплікації вірусу в зараженій клітині та безпосередній вплив СК на транспорт вірусу по плазмодесмам шляхом зміни провідності останніх [11].

**Мета** досліджень — вдосконалення технологічного процесу оздоровлення сорту картоплі за використання саліцилової кислоти.

**Методика досліджень.** Для дослідження було відібрано рослини картоплі сорту Слов'янка, уражені вірусом скручування листя картоплі (ВСЛК). Контролем слугували рослини картоплі, не уражені даною інфекцією. Досліджували у лабораторії біотехнології та селекційного відбору сортів диференціаторів картоплі упродовж 2013—2014 рр.

Відбір вихідних рослин картоплі для оздоровлення здійснювали на насінницьких ділянках Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН. Під час вегетації в умовах відкритого ґрунту відшукували розвинені кущі з типовими сортовими ознаками. Перевіряли наявність в них латентних вірусних інфекцій візуальним та імунологічним методами. Відібрані бульби проходили термотерапію.

Сорт, що оздоровлюється, в

культуру *in vitro* вводили за стандартною методикою з використанням 70% етанолу та 0,1%-ого розчину діациду; час стерилізації — від 5 до 7 хв. Виділяли експланти розміром 400—500 мкм. Для регенерації рослин картоплі використовували середовище Мурасіге-Скуга в модифікації Інституту картоплярства [12]. Щоб запобігти утворенню калюса пробірки поміщали в умови з розсіяним освітленням на 3—4 дні, після чого їх культивували в умовах кімнати за умов 16-годинного фотоперіоду, інтенсивності освітлення 2000—2500 лк, температури 22—25°C та відносної вологості повітря 70—80%. Під час регенерації живці послідовно пересаджували на свіжі живильні середовища, видаляючи відмерлі тканини.

Для оздоровлення сортів картоплі застосовували хіміотерапію СК, яку стерилізували через мембранний фільтр ( $d=0,22 \mu\text{m}$ ) і вносили у живильне середовище після автоклавовування. Як вихідний матеріал для хіміотерапії *in vitro* використовували інфіковані ВСЛК рослини картоплі. Контрольні варіанти включали живильне середовище Мурасіге-Скуга без внесення СК. Для кожного варіанту досліду використовували по 10 мікроклональних рослин. Порівняльну оцінку впливу різних концентрацій СК на вміст ВСЛК в експлантах рослин картоплі проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням комплексу реактивів, синтезованих у ВНІІКГ ім. А.Г. Лорха, методика яких супроводжується детальними інструкціями [13].

Для тестування матеріалу з культури *in vitro* відбирали частину експланта рослин картоплі сорту Слов'янка, 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 рослин картоплі на модифікованому живильному середовищі Мурасіге-Скуга до кількості, яка необхідна для експерименту. Надалі регеновані інфіковані клональні мікророслини, за винятком контролю, переносили на живильне середовище Мурасіге-Скуга з аналогічним складом, але з внесенням СК різної концентрації (варіанти: I — 10; II — 15; III — 20; IV — 25 мг/л). Тривалість

культивування становила 4 тижні, після чого зразки перевіряли на наявність у них ВСЛК 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 картоплі та оптичної густини першого із зразків:

$$A = \frac{\text{ОД contri} - \text{ОД expi}}{\text{ОД contri} \%}$$

де ОД contri — значення оптичної густини контрольного інфікованого зразка;

ОД expi — значення оптичної густини експериментального зразка.

**Результати досліджень.** Збудник вірусу скручування листків картоплі — *Potato leafroll virus*, PLRV, ВСЛК — найпоширеніший у Європі. Збитки, яких завдає вірус скручування листків картоплі, дуже великі. На окремих сортах кількість хворих рослин сягає 50—80%. Недобір урожаю бульб, залежно від ступеня прояву хвороби, становить 30—80% і більше; вміст крохмалю в бульбах зменшується на 2—5% [14].

У рік зараження симптоми захворювання проявляються у вигляді легкого скручування часточок верхівкових листків навколо середньої жилки (рис. 1, а).

Вторинні симптоми виявляються у вигляді скручування листків нижніх ярусів з поширенням ознак ураження вгору по рослині. Уражені листки потовщуються, стають шкірястими. При згинанні вони легко ламаються. Нижня поверхня листків стає сріблястою або набуває антоціанового забарвлення. Дуже уражені рослини різко відстають у рості, мають загальний хлоротичний вигляд (рис. 1, б).

Хвороба передається з бульбами, причому з кожною наступною репродукцією симптоми захворювання посилюються.

У польових умовах вірус переноситься в основному попелицями. Також можлива передача вірусу під час щеплення. Встановлено, що найбільш інтенсивно вірусом L заражаються рослини у молодому віці [15].

У процесі досліджень встановили, що антивірусний препарат (СК) під час хіміотерапії впливає на морфогенез і регенерацію рослин. Досліджуваний сорт картоплі виявив різнотипову реакцію на оздоровлення. Виявлено і морфологічні відмінності. У сорту Слов'янка меристеми на середовищі з СК у концентрації 15 мг/л мали антоціанове забарвлення, а на середовищі з концентрацією 20 мг/л — жовте. У меристем антоціанового та жовтого кольорів морфогенез проходив інтенсивніше, час до одержання регенерантів скорочувався на 1—2 тижні (4—6 тижнів культивування).



а



б

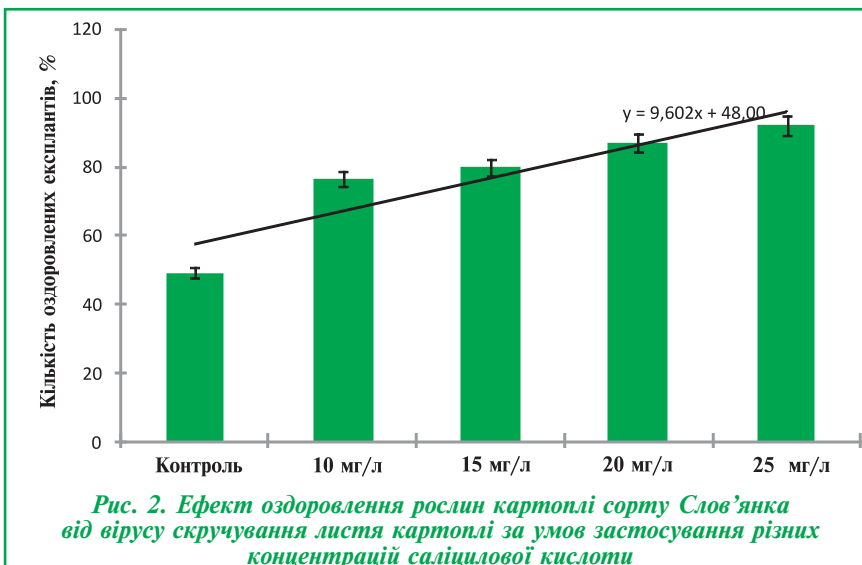
Рис. 1. Симптоми вірусу скручування листків картоплі (сорт Слов'янка) на дослідній ділянці Української науково-дослідної станції карантину рослин Інституту захисту рослин НААН України (с. Бояни Новоселицького району Чернівецької області, 2013 р.): а — симптоми захворювання у рік зараження; б — вторинні симптоми зараження

У меристем білого кольору морфогенез затримувався на 4 тижні, проте регенерація відбувалась більш інтенсивно. Аналізуючи одержані дані, можна сказати, що СК стимулює ріст як коренів, так і пагонів рослин картоплі. Довжина коренів рослин, які культивувалися на середовищі Мурасіге-Скуга із вмістом СК 10 мг/л, перевищувала довжину коренів контрольних рослин у 1,6, а пагонів — у 1,4 раза. Проте збільшення морфометричних параметрів рослин із зростанням концентрації СК у живильному середовищі не було прямопропорційним.

У наших дослідженнях виявлено негативну достовірну кореляцію між кількістю СК у живильному середовищі Мурасіге-Скуга і ВСЛК в експлантах рослин картоплі сорту Слов'янка (табл.).

Необхідно зазначити, що зниження концентрації ВСЛК в експлантах рослин картоплі сорту Слов'янка відбувалось лінійно і за умов додавання у живильне середовище 10 мг/л СК становило 76,5% (рис. 2).

Використання СК у концентраціях 15 і 20 мг/л спричинило зменшення рівня ВСЛК в експлантах рослин картоплі сорту Слов'янка на 79,8 та 86,8% відповідно, а за підвищення її рівня до 25 мг/л — зростання до 91,9%. Наші результати засвідчують, що різні концентрації СК не викликають повної елімінації ВСЛК в експлантах рослин картоплі сорту Слов'янка. Подальше збільшення рівня СК в живильному середовищі до 30 мг/л індукує зменшення інтенсивності процесів росту, розвитку та загибель експлантів рослин картоплі.



**Рис. 2.** Ефект оздоровлення рослин картоплі сорту Слов'янка від вірусу скручування листя картоплі за умов застосування різних концентрацій саліцилової кислоти

**Середні значення оптичної густини контрольних (без внесення СК) і експериментальних (з внесенням СК) зразків рослин картоплі**

Контроль		Концентрація СК, мг/л			
позитивний	негативний	10	15	20	25
0,212±0,04	0,1±0,04	0,1307±0,36	0,1252±0,03	0,1151±0,01	0,1088±0,01

**ВИСНОВОК**

Дослідженнями визначено оптимальні концентрації противірусного препарату (саліцилової кислоти) за проведення хіміотерапії та вищущування регенерантів картоплі. Ефективність хіміотерапії зростала на 30%, порівняно з термотерапією. Використання саліцилової кислоти дозволило звільнити рослинний матеріал від ВСЛК на 91,9%.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Бондарчук А.А. Стан та пріоритетні напрями розвитку ринку насінневої картоплі в Україні / А.А. Бондарчук // Картоплярство. — 2009. — № 38. — С. 3—24.
2. Шалабай В.И. Величина терминальной безвирусной зоны у растений картофеля / В.И. Шалабай, И.П. Жук // Современные методы получения безвирусного картофеля. — М.: ВАСХНИЛ, 1975. — 96 с.
3. Рудишин С.Д. Основы биотехнології рослин / С.Д. Рудишин. — Вінниця, 1998. — 224 с.
4. MacKinnon J. Comparative rates of potato virus X into tubers and eyes of three potato varieties. / J. Munro, J. MacKinnon // Am. potato J. — 1959. — №36. — Р. 410—413.
5. Трускинов Э.В. Опыт оздоровления от вирусных коллекционных образцов картофеля путем культуры меристемной ткани / Э.В. Трускинов // Современные методы получения безвирусного картофеля. — М.: ВАСХНИЛ, 1975. — 96 с.
6. Трофимец Л.Н. Методы лечения картофеля, зараженного вирусными болезнями / Л.Н. Трофимец, П.А. Хижняк, А.П. Кучумов // М.: ВАСХНИЛ, 1978. — С. 232.
7. Харіна А.В. Хіміотерапія вірусних інфекцій / А.В. Харіна, І.Г. Будзанівська, В.П. Поліщук // К., 2003. — 123 с.

8. Власов Ю.И. Сельскохозяйственная вирусология / Ю.И. Власов, Э.И. Ларина // М.: Колос, 1982. — С. 200—202.

9. Mur L. Comptomicing Early Salicylic Acid Accumulation Delays the hypersensitive Response and Increases Viral Despersal during Lesion Establishment in TMV-Infected Tobacco / L. Mur, Y.M. Bi, R. Darby, S. Firek, J. Draper // Plant J. — 1997. — V. 12. — P. 1113—1126.

10. White R. Acetylsalicylic acid (Aspirin) Induces Resistance to Tobacco Mosaic Virus in Tobacco / R. White // Virology. — 1979. — Vol. 99. — P. 410—412.

11. Может ли салициловая кислота влиять на межклеточный транспорт вируса табачной мозаики через изменение проводимости плазмодесм / [М.С. Красавина, С.И. Малышенко, Г.Л. Ралдугина и др.] // Физиология растений. — 2002. — Т. 49. — №1. — С. 71—77.

12. Методичні рекомендації. Оздоровлення сортів картоплі методом культури апікальних меристем / [Т.М. Олійник, К.А. Слободян, О.О. Шевченко та ін.]: Ін-т картоплярства НААН. — Немішаєве; К.: ТОВ "КВІЦ", 2012. — 28 с.

13. Методика Всероссийского научно-исследовательского института картофелеводства им. А. Лорха. — Коренево, 2008. — 8 с.

14. Коломієць Л.П. Характеристики вірусів, що уражають картоплю / Л.П. Коломієць [Електронний ресурс] — Режим доступу: [http://www.nbu.gov.ua/portal/Chem\\_Biol/sgmb/2008\\_7/2008/SM07\\_17.pdf](http://www.nbu.gov.ua/portal/Chem_Biol/sgmb/2008_7/2008/SM07_17.pdf).

15. Зыкин А.Г. Вирусные болезни картофеля / А.Г. Зыкин. — Колос, 1976. — 152 с.

**Шевага Г.М., Бундук Ю.М., Гунчак В.М., Кирик М.М.**

**Эффект салициловой кислоты на оздоровление растений картофеля**

*Исследовано влияние салициловой кислоты (в концентрациях 10, 15, 20, 25 мг/л) на морфометрические показатели и процесс оздоровления сортов картофеля методом культуры меристемы в сочетании с химиотерапией от вируса скручивания листьев картофеля.*

**віруси картофеля, апікальні меристеми, хіміотерапія**

**Shevaha G.M., Bunduk U.M., Hunchak V.M., Kyryk M.M.**

**Effect of salicylic acid at improving potato plants**

*The effect of salicylic acid (at concentrations of 10, 15, 20, 25 mg/l) on morphometric parameters and the process of recovery potato varieties by meristem culture combined with chemotherapy of virus from curling leaves of potato.*

**potato viruses, apical meristem chemotherapy**

Рецензент:

Зеля А.Г., кандидат біологічних наук  
Українська науково-дослідна станція карантину рослин ІЗР