

УДК 634.11:631.541.11]:631.533.3:581.143.6:632.953.2

ПОСЛЕДЕЙСТВИЕ САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОДВОЯ ЯБЛОНИ 62-396 В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

А.А. Змушко, С.Э. Семенас

РУП «Институт плодородства»,

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

e-mail: AlexanderZM@yandex.ru

РЕФЕРАТ

Изучали морфологические параметры растений-регенерантов районированного клонового подвоя яблони 62-396, как инфицированного, так и неинфицированного вирусом ACLSV, на стандартной питательной среде после одного пассажа культивирования на средах с различными концентрациями салициловой кислоты. Для растений, свободных от вируса хлоротической пятнистости листьев яблони, показано, что добавление в стандартную среду для размножения салициловой кислоты статистически достоверно снижает среднюю длину побегов и коэффициент размножения на последующих пассажах. Добавление салициловой кислоты приводило также к достоверному возрастанию степени витрификации микропобегов. Для растений, инфицированных ACLSV, продемонстрировано, что культивирование на средах, содержащих салициловую кислоту, вызывает увеличение процента некроза и каллусообразования при дальнейшем культивировании на стандартной питательной среде. Для хемотерапии вирусов *in vitro* рекомендуем использовать концентрацию 30 мг/л салициловой кислоты.

Ключевые слова: оздоровление от вирусов, клоновый подвой яблони 62-396, хемотерапия, ACLSV, салициловая кислота, последствие, культивирование *in vitro*, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные болезни плодовых культур стали в последнее время объектом интенсивного изучения практически во всех странах мира. Главными причинами столь пристального внимания являются значительная распространённость и высокая вредоносность ряда вирусных заболеваний [1]. Потери урожая яблони от вирусных заболеваний могут достигать 97%. Поэтому выгодно, а часто необходимо, освободить растения от инфекции, если тот или иной сорт планируют размножить в промышленном масштабе [2].

В Беларуси широко распространён вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV). Он входит в список недопустимых для категории *Virus Free* (класс А) [3, 4]. ACLSV относится к семейству *Flexiviridae* рода *Trichovirus* [5], поражает практически всех представителей семейства *Rosaceae* [6] и является наиболее распространённым вирусом яблони и груши [7]. В Беларуси в некоторых садах вирусом ACLSV заражены не менее 86,67% яблонь [8]. Ещё в 1979 г. он являлся самым распространённым вирусом яблони в Беларуси [9].

Традиционными способами получения безвирусного посадочного материала являются термотерапия, хемотерапия и культура апикальных меристем (клональное микро размножение). При этом эффективность элиминации вирусов зависит также от типа вируса и растения-хозяина [10].

Во многих случаях эффективным является сочетание методов хемотерапии и культуры меристем. Применение химиотерапевтических методов позволяет значительно упростить методику оздоровления и повысить результативность оздоровления растений по сравнению с другими методиками [11, 12, 13, 14].

Спектр химических соединений, применяющихся для хемотерапии вирусных заболеваний растений, достаточно широк. К ним относятся ДНТ (2,4-диоксигексогидротриазид, ДГТ), его производные НЕО-ДНТ и DIAC-ДНТ, аналоги нуклеотидов: виразол (рибавирин) – аналог гуанозина (1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазолкарбоксамид), 2-тиоурацил, цианогуанидин. Используют также алкилсульфонат, гипорамин, кислоты (салициловая, ацетилсалициловая, галловая, сиреневая, феруловая, п-кумаровая, акриловая), интерферон человеческий лейкоцитарный, антибиотики, активные против вируса герпеса, гриппа, чешуйчатого лишая (адималь, флореналь, бонафтон, оксолин, теброфен, декстромицетин), циклоалифатические препараты. Дополнительным классом противовирусных веществ являются бактериальные РНКазы – биназа (бактериальная РНК-деполимераза) и барназа, препараты рифастин и ридостин – очищенная двуспиральная РНК фага f_6 [11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21]. Было установлено, что противовирусные препараты обладают различной эффективностью по отношению к вирусам и их группам. Например, в работе А.Д. Петровой и М.Т. Упадышева [20] было показано, что салициловая и галловая кислоты у груши подавляли ИЛАР-вирусы, салициловая и сиреневая кислоты – вирусы PNRSV и PPV (некротической кольцевой пятнистости и шарки сливы) у рябины; салициловая, галловая, феруловая и п-кумаровая кислоты ингибировали вирус SLRV (латентной кольцевой пятнистости земляники) у ежевики и малинно-ежевичных гибридов.

Однако следует подчеркнуть, что даже высокоэффективные, широко применяемые вироциды зачастую обладают фитотоксичным действием: замедляют процессы дифференциации меристематической ткани, развитие и рост побегов по сравнению с контролем, обладают мутагенными свойствами и оказывают другое негативное воздействие на растительную ткань [12, 14, 16].

Цель данной работы – изучить влияние салициловой кислоты на морфологические параметры растений-регенерантов в культуре *in vitro* районированного в Республике Беларусь клонового подвоя яблони 62-396.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследования являлись растения районированного клонового подвоя яблони 62-396, как инфицированного, так и не инфицированного вирусом хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV). Обе группы растений-регенерантов подвоя 62-396 культивировали в течение одного пассажа на питательных средах, содержащих салициловую кислоту в различных концентрациях. После этого регенеранты пересаживали на среду такого же состава, не содержащую антивирусных веществ. Контролем служили те же растения, постоянно растущие на стандартной питательной среде для размножения. Через 30 дней после пересадки на стандартную среду производили учёт морфологических параметров растений-регенерантов.

Для культивирования использовали модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга с концентрацией индолилмасляной кислоты (ИМК) – 0,2 мг/л, концентрацией гибберелловой кислоты (GA_3) – 2,0 мг/л, и концентрацией 6-бензиламинопурина (БА) – 2,0 мг/л. В опытных вариантах использовали питательные среды, дополненные 30, 50 и 70 мг/л салициловой кислоты. Длительность пассажа во

всех вариантах опыта составляла 30 суток. Статистическую обработку проводили в программе Excel.

Для установления последствий салициловой кислоты на рост и развитие культивируемых *in vitro* растений-регенерантов подвоя 62-396 изучали следующие морфологические параметры: коэффициент размножения, среднюю длину побегов, частоту и степень проявления признаков некроза, этиолизации, витрификации побегов и каллусообразования.

Расчет степени некроза, этиолизации, витрификации и каллусообразования велся визуально по разработанной нами схеме:

«-» (0% пораженных тканей в конгломерате микрорастений) – полное отсутствие признака;

«+» (33,33%) – объём видоизменённых (некротировавших, каллусных, витрифицированных) тканей составляет менее чем 1/3 от общего объёма микроконгломерата;

«++» (66,67%) – объём изменённых тканей составляет от 1/3 до 2/3 от общего объёма микроконгломерата;

«+++» (100%) – объём изменённых тканей составляет более 2/3 от общего объёма микроконгломерата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения морфологических параметров растений-регенерантов клонового подвоя 62-396 представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 – Влияние концентрации салициловой кислоты в питательной среде на морфологические параметры неинфицированных растений-регенерантов подвоя 62-396

Питательная среда	Морфологические параметры					
	Средняя длина, мм	Коэффициент размножения	Доля пораженных тканей, %			
			витрифицированных	калусных	этиолированных	некротизированных
стандартная (контроль 1)	11,28±1,51	4,39±0,6	1,85±1,85	14,81±6,16	1,85±1,85	0
30 мг/л салиц. к-ты	7,63±0,96	2,64±0,34	0	9,52±4,18	0	2,38±2,38
50 мг/л салиц. к-ты	6,17±2,31	2,2±0,29	43,33±10,00	3,33±3,33	0	3,33±3,33
70 мг/л салиц. к-ты	6,38±1,11	2,29±0,33	23,53±5,55	15,69±7,07	0	0

Таблица 2 – Влияние концентрации салициловой кислоты в питательной среде на морфологические параметры инфицированных ACLSV растений-регенерантов подвоя 62-396

Питательная среда	Морфологические параметры					
	Средняя длина, мм	Коэффициент размножения	Доля пораженных тканей, %			
			витрифицированных	калусных	этиолированных	некротизированных
стандартная (контроль 2)	7,47±0,64	2,7±0,22	28,57±3,28	7,41±1,92	0	1,06±0,74
30 мг/л салиц. к-ты	9,6±3,47	2,97±0,19	24,24±3,02	14,64±2,29	0,51±0,51	2,02±0,99
50 мг/л салиц. к-ты	6,32±0,88	2,55±0,22	22,99±5,26	18,38±3,54	0	10,34±3,35
70 мг/л салиц. к-ты	6,32±0,45	2,98±0,24	22,02±3,63	11,31±2,72	1,19±1,19	5,36±1,65

Салициловая кислота оказывала достоверное влияние на коэффициент размножения неинфицированных микропобегов 62-396. Было отмечено значительное снижение данного параметра: с $4,39 \pm 0,6$ – для растений на стандартной питательной среде (контроль 1) до $2,29 \pm 0,33$ – для растений, прошедших один пассаж размножения на питательной среде, содержащей 70 мг/л салициловой кислоты соответственно. Степень этиолизации, некроза и каллусообразования у неинфицированных ACLSV подвоев после пассажа на питательных средах с различной концентрацией салициловой кислоты менялась незначительно. Было отмечено достоверное при уровне значимости $p=0,001$ влияние салициловой кислоты на степень витрификации растений-регенерантов. Если в контрольном варианте степень витрификации составляла $1,85 \pm 1,85\%$, то после культивирования на питательной среде, содержащей 70 мг/л салициловой кислоты, этот показатель возрастал до $23,53 \pm 5,55\%$. Витрификация нежелательна при размножении *in vitro*, поскольку витрифицированные побеги зачастую обладают хрупкостью и низкой жизнеспособностью.

Дисперсионный анализ показал, что салициловая кислота оказывает достоверное влияние при уровне значимости $p=0,05$ на среднюю длину побегов неинфицированных клоновых подвоев яблони. При этом была отмечена тенденция к сокращению средней длины побегов с возрастанием концентрации салициловой кислоты в питательной среде. Средняя длина побега неинфицированного подвоя 62-396, выращиваемого на питательной среде без добавления салициловой кислоты (контроль 1), составила $11,28 \pm 1,51$ см, в то время как средняя длина побегов неинфицированных растений-регенерантов 62-396 после одного пассажа на питательной среде с салициловой кислотой в концентрациях 30 и 70 мг/л составила $7,63 \pm 0,96$ см и $6,38 \pm 1,11$ см соответственно.

При изучении влияния салициловой кислоты на морфологические параметры растений-регенерантов подвоя 62-396, инфицированного вирусом ACLSV, было установлено, что даже после пересадки на стандартную питательную среду для размножения растения сохранили тенденцию к возрастанию степени каллусообразования и некроза, а также к некоторому снижению средней длины побегов. Процент некроза статистически достоверно возрастал в вариантах опыта с 50 и 70 мг/л салициловой кислоты при уровне значимости $p=0,05$. Влияние салициловой кислоты на каллусообразование было достоверным при уровне значимости $p=0,05$. Влияние салициловой кислоты на среднюю длину и коэффициент размножения у инфицированных вирусом ACLSV подвоев было статистически недостоверным во всех вариантах опыта.

Следует отметить, что средняя длина и коэффициент размножения инфицированных и неинфицированных подвоев достоверно различались.

Полученные данные позволяют говорить о том, что салициловая кислота обладает выраженным фитотоксичным действием. Даже после пересадки на стандартную питательную среду для размножения изучаемые растения сохранили симптомы, свидетельствующие об ингибировании их ростовых параметров.

Реакции инфицированных и неинфицированных подвоев на салициловую кислоту в различных концентрациях различались достоверно лишь в двух из изученных 18 вариантов: на питательной среде с 50 мг/л салициловой кислоты инфицированные вирусом микропобеги проявили намного большую степень каллусообразования, чем безвирусные; процент витрифицированных тканей на питательной среде с 30 мг/л салициловой кислоты был достоверно выше у инфицированных вирусом ACLSV микропобегов в сравнении с неинфицированными. По всей видимости, это свидетельствует о том, что инфицирование вирусом ACLSV так же, как и присутствие салициловой кислоты в питательной среде, стимулирует возникновение витрифицированных и каллусных тканей.

Сравнение контроля 1 (безвирусные растения) и контроля 2 (заражённые вирусом ACLSV растения), культивируемых на стандартных питательных средах, позволяет утверждать, что инфицирование вирусом ACLSV приводит к статистически достоверному уменьшению средней длины побегов и коэффициента размножения, а также к возрастанию степени витрификации микропобегов.

ВЫВОДЫ

Добавление салициловой кислоты в питательную среду оказывает заметное отрицательное воздействие на жизнеспособность растений-регенерантов изучаемого подвоя. Этот эффект сохраняется на следующем пассаже, при культивировании на стандартной питательной среде. Отмечена тенденция к уменьшению средней длины растений и коэффициента размножения с возрастанием концентрации салициловой кислоты. При использовании данного противовирусного агента для хемотерапии вирусов *in vitro* рекомендуем выбирать более низкие концентрации (30 мг/л) для обеспечения дальнейшего микроразмножения и получения жизнеспособных растений-регенерантов.

Литература

1. Vasuta, S.A. Study of hybrid *Persica vulgaris* Mill. x *P. davidiana* Carr. as a virus free rootstock / S.A. Vasuta, I.K. Kudrenko, P. Salaš // Proceedings of 9th International Conference of Horticulture, September 3th – 6th 2001, Lednice, Czech Republic. – Lednice, 2001. – Volume 2. – P. 250-255.
2. Деменко, Е.И. Сравнительная оценка вегетативных способов размножения яблони в системе производства здорового посадочного материала / Е.И. Деменко, Л.В. Михальчик // Доклады ТСХА. – 1996. – Вып. 267. – С. 84-92.
3. Самусь, В.А. Вирусные заболевания яблони в условиях Беларуси / В.А. Самусь, Н.В. Кухарчик // Земляробства і ахова раслін. – 2003. – № 4. – С. 38-39.
4. Положение о производстве посадочного материала плодовых и ягодных культур в Республике Беларусь / РУП «Институт плодоводства»; сост. В.А. Самусь, Н.В. Кухарчик. – Самохваловичи, 2007. – 32 с.
5. Ulubaş, Ç. Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques / Ç. Ulubaş, F. Ertunç // Turk J Agric For. – 2005. – № 29. – P. 251-257.
6. Topchiiska, M. Apple chlorotic leaf spot virus in *Prunus* spp. in Bulgaria / M. Topchiiska // Plant science. – 1995. – № 32, 4. – P. 24-27.
7. Malinovski, T. Characterization of monoclonal antibodies against apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and their application for detection of ACLSV and identification of its strains / T. Malinovski [et al.] // Phytopathol. Pol. – 1997. – № 14. – P. 35-40.
8. Семенас, С.Э. Предварительная оценка распространённости некоторых патогенных вирусов в центральной зоне Беларуси / С.Э. Семенас, Н.В. Кухарчик // Плодоводство: науч. тр. / БелНИИ плодоводства; редкол.: В.А. Самусь (гл. ред.) [и др.]. – Самохваловичи, 2000. – Т. 13. – С. 109-111.
9. Амбросов, А.Л. Вирусные и микоплазменные болезни яблони в Белорусской ССР / А.Л. Амбросов, О.С. Мерцалова // Садоводство. – 1979. – Вып. 27. – С. 46-51.

10. Cieślińska, M. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus* sp. fruit trees / M. Cieślińska // Journal of fruit and ornamental plant research. – 2007. – Vol. 15. – P. 117-124.

11. Оздоровление земляники методом культуры апексов при использовании синтетических ингибиторов вирусов / П. М. Малыхин [и др.] // Известия ТСХА. – 1986. – Вып. 3. – С. 135-137.

12. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приёмы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / О.В. Митрофанова [и др.]. – Ялта, 2000. – 46 с.

13. Приходько, Ю.Н. Совершенствование технологии оздоровления яблони от латентных вирусов / Ю.Н. Приходько, Д.Н. Редин, В.И. Кашин // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: В.И. Кашин [и др.]. – М., 2000. – Т. VII. – С. 89-101.

14. Лукьянова, Е.А. Изучение возможности использования бактериальных рибонуклеаз для хемотерапии в культуре *in vitro* [Оздоровление плодовых и ягодных культур от вирусных инфекций] / Е.А. Лукьянова // Молодые ученые – садоводству России. – М., 1995. – С. 117–119.

15. Богущ, Л.Ю. Влияние некоторых веществ на инактивацию вируса некротической кольцевой пятнистости в сеянцах черешни / Л.Ю. Богущ // Вирусные заболевания культурных растений Молдавии. – Кишинев: Штиинца, 1984. – С. 20-25.

16. Cieślińska, M. Preliminary results of investigation of elimination of viruses from apple, pear and raspberry using thermotherapy and chemotherapy *in vitro* / M. Cieślińska, B. Zawadska // Phytopathol. Pol. – 1999. – № 17. – P. 41-48.

17. Klein, R.E. Eradication of potato viruses X and S from potato shoot-tip cultures with ribavirin / R.E. Klein, C.H. Livingston // Phytopathology. – 1983. – № 73. – P. 1049-1050.

18. Gabova, R. Chemotherapy treatment of *Prunus* spp. genotypes infected by plum pox virus / R. Gabova // Plant Science. – 1995. – № 4. – P. 16-18.

19. Хромова, Л.М. Культивирование верхушечных меристем картофеля для оздоровления сортов от вирусных болезней / Л.М. Хромова // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. – М.: Колос, 1979. – С. 128-137.

20. Петрова, А.Д. Хемотерапия и размножение садовых культур на питательных средах с фенолкарбоновыми кислотами / А.Д. Петрова, М.Т. Упадышев // Плодоводство и ягодоводство России: сб. науч. работ / ВСТИСП; редкол.: В.И. Кашин [и др.]. – М., 2000. – Т. VII. – С. 67-72.

21. Колбанова, Е.В. Микроразмножение и оздоровление от сокопереносимых вирусов смородины чёрной в культуре *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23; 06.01.11 / Е.В. Колбанова; ГНУ «Институт микробиологии». – Мн., 2003. – 20 с.

**AFTEREFFECT OF SALICYLIC ACID ON MORPHOLOGICAL PARAMETERS
OF APPLE CLONAL ROOTSTOCK 62-396 IN IN VITRO CULTURE**

A.A. Zmushko, S.E. Semenas

ABSTRACT

The morphological parameters of apple clonal rootstock 62-396 (infected and non-infected by ACLSV) on standard medium after one passage of its cultivation on nutrient media containing salicylic acid in different concentrations were studied. It was established that cultivation of non-infected plants on media with salicylic acid caused significant reduce of average shoot length and propagation coefficient during subsequent passages. Addition of salicylic acid led to significant increase of microcutting vitrification rate.

It was shown for regenerants infected by ACLSV that cultivation on media with salicylic acid resulted in increase of necrosis rate and callus formation during subsequent cultivation on standard nutrition medium. It was shown that salicylic acid addition to nutrient medium affected vital capacity of the studied rootstock regenerants; both infected and non-infected plants demonstrated this effect. We recommend using of 30 mg/l of salicylic acid for chemotherapy.

Key words: virus elimination, apple clonal rootstock 62-396, ACLSV, salicylic acid, aftereffect, in vitro cultivation, Belarus.

Дата поступления статьи в редакцию 08.04.2011