

ДОСЛІДЖЕННЯ НЕСПЕЦИФІЧНОЇ СТІЙКОСТІ РОСЛИН ПОМІДОРА
ДО М- ТА Y-ВІРУСІВ КАРТОПЛІ

О.І. ДАНІЛОВА – аспірантка*

КНУ імені Тараса Шевченка,

Навчально-науковий центр «Інститут біології»

Встановлено зниження концентрації антигенів МВК у рослинах помідорів, які піддавалися сумісній дії регуляторів росту природного походження та тривалого кліноштатування, що свідчить про індукцію захисних реакцій рослин та формування неспецифічної стійкості їх проти вірусної інфекції. На основі проведених досліджень виділено чотири сорти помідорів, стійких проти ураження М- та Y-вірусів картоплі.

Ключові слова: М-вірус картоплі, Y-вірус картоплі, неспецифічна стійкість, модельована мікрогравітація, регулятори росту рослин.

Попередніми нашими дослідженнями показано, що у період з 2009 до 2013 рр. у відкритому ґрунті чотирьох областей зони Лісостепу (Кіровоградській, Харківській, Полтавській і Київській) 18-25% рослин помідора були уражені М-вірусом (МВК) та Y-вірусом картоплі (YBK) [2,5]. Необхідно також відзначити, що під час досліджень виявили шкідливий вплив цих вірусів на рослини. Наприкінці вегетації вірусне захворювання проявляється на плодах у вигляді некротичних плям з подальшим швидким гниттям, що псує товарний вигляд продукції та скорочує термін її зберігання. Встановлено, що за дії М- та Y-вірусів картоплі відбувається суттєве зниження кількісного вмісту каротиноїдів лікопіну та β -каротину у плодах помідора [8].

* Науковий керівник – кандидат біологічних наук, професор Л.Т. Міщенко

Високий ступінь ураженості рослин та шкідливість вірусів зумовлюють пошук заходів захисту помідора від цих патогенів. Вирощування овочевих та інших культур, які споживаються людиною, потребує застосування безпечних заходів. Як відомо, використання хімічних сполук не завжди ефективно і безпечно, оскільки вони мають кумулятивні властивості, що призводить до поступового отруєння не лише об'єкта, проти якого вони були спрямовані, а й інших живих компонентів екосистем, у тому числі і людини. Ця проблема особливо актуальна для помідорів, плоди яких широко використовуються у харчуванні дітей та дорослих. Тому застосування хімічних засобів захисту від хвороб на помідорах має бути обмеженим.

На нашу думку, індукована стійкість, яка використовує природні захисні функції рослин, є альтернативним та екологічно-безпечним методом захисту рослин. Сучасні дослідження впливу модельованої мікрогравітації на перебіг вірусної інфекції у рослинах свідчать про зниження концентрації вірусів за таких умов [7,3]. Так, у попередніх дослідженнях з рослинами картоплі та пшениці обґрунтовано, що умови кліноштатування мають стресовий вплив на рослинний організм та корегують перебіг вірусної інфекції в різних модельних системах. Дослідження перебігу вірусних інфекцій в умовах модельованої мікрогравітації є перспективним напрямом вивчення і практичного використання механізмів стійкості рослин проти вірусів [15-17].

Мета дослідження полягала у вивченні перебігу МВК-інфекції в рослинах помідора за дії регуляторів росту природного походження в умовах модельованої мікрогравітації та проведенні скринінгу його сортів стійких проти МВК та УВК.

Матеріали і методи досліджень. Виділення вірусів із уражених рослин помідора проводили за загально відомими методиками у нашій модифікації [9,10].

Для дослідження стійких сортів помідора застосовували метод біологічного тестування [1]. Механічну інокуляцію рослин помідора проводили

очищеними та сконцентрованими препаратами МВК та УВК із подальшою детекцією вірусів методом трансмісійної електронної мікроскопії та твердофазного імуоферментного аналізу (сендвіч-варіант).

Препарати для ЕМ готували методом негативного контрастування у 2%-му розчині фосфорно-вольфрамової кислоти та досліджували за допомогою електронних мікроскопів JEM 1230 (JEOL, Японія) та EM-125 (Суми, Україна) [12].

Для постановки ІФА використовували комерційні тест-системи фірми LOEWE (Німеччина). Результати реакції реєстрували на рідері Termo Labsystems Opsis MR (США) з програмним забезпеченням Dynex Revelation Quicklink при довжинах хвиль 405/630 нм. Достовірними вважали значення, що перевищували негативний контроль у три рази [13].

На основі вивчення індукції неспецифічної стійкості у інфікованих рослин помідора під впливом модельованої мікрогравітації та регуляторів росту було розроблено модельну систему: для дослідження перебігу МВК-інфекції «М-вірус картоплі– рослини помідора. Мікрогравітацію моделювали в кліноостаті «КГ-8» за умов горизонтального кліноостатування (ГК), при якому вісь росту рослин розміщена горизонтально і збігається з віссю обертання контейнерів [11]. Рослини помідора у контейнерах розміщали у кліноостат в умовах штучного освітлення (15-20 тис. лк). Тривалість світлового періоду становила 16 год, відносна вологість – 70-80%, температура культивування 20-22° С, тривалість кліноостатування 20 діб. У роботі застосовували два нерухомих контролю: стаціонарний №1 (здорові рослини), стаціонарний № 2 (вірусінфіковані рослини) та два рухомі: контроль №3 (здорові рослини, оброблені рістрегуляторами, які розміщували у кліноостаті), контроль № 4 – здорові рослини, не оброблені регуляторами росту.

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями нормального розподілу варіант, стандартне відхилення середніх значень – за загальноприйнятою методикою [6].

Гумати (фенолвмісні препарати природного походження – оксидат торфу і гідрогумат) були люб’язно надані РУП «Інститут природних сполук» НАН Білорусі. Рослини помідора у фазі чотирьох справжніх листів позакоренево обробляли 0,1% - ними розчинами препаратів оксидата торфу і гідрогумату. Контролем слугували рослини помідора, оброблені дистильованою водою.

Результати досліджень. Для виявлення впливу дії цих двох чинників провели дослідження з рослинами помідора сорту Кримська сливка, штучно інокульованих М-вірусом картоплі, які культивували в умовах модельованої мікрогравітації (рис.1).



Рис. 1 Вирощування рослин помідора у кліностаці КГ-8 та стаціонарні (нерухомі) контролі

На 11-ту добу після інокуляції антигени МВК були виявлені у кліностатованих рослинах помідора, які не оброблялися рістрегуляторами, а також у варіанті з використанням оксидату торфу (рис. 2, 3).

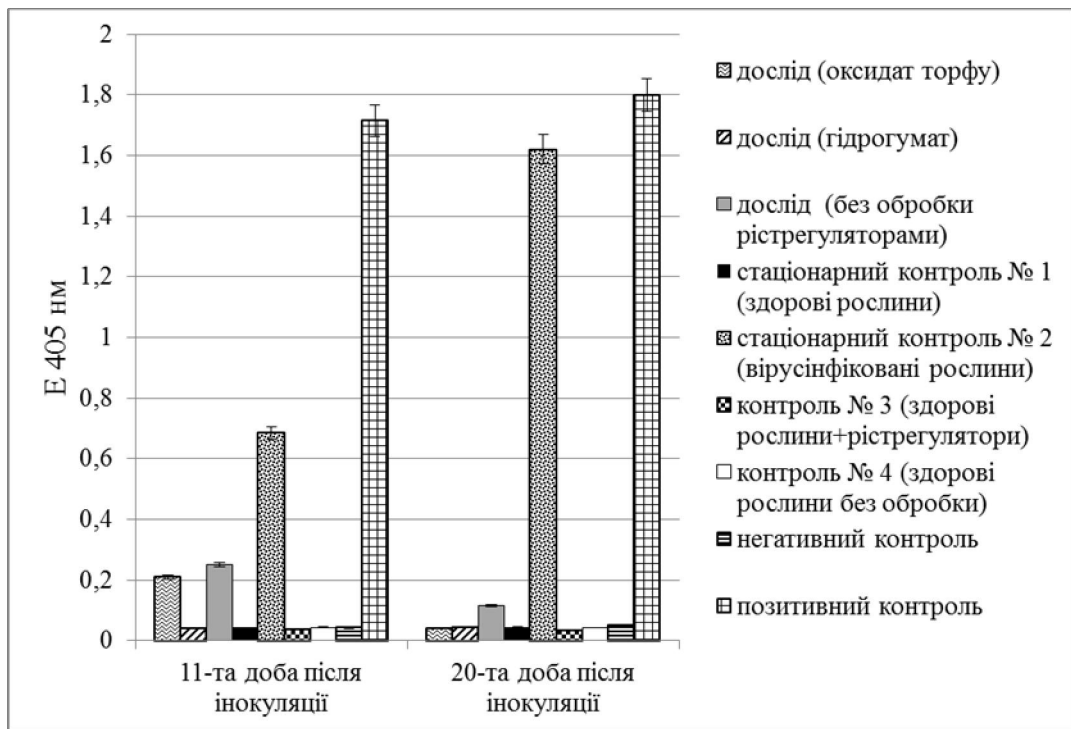


Рис. 2. Вміст антигенів МВК у рослинах помідора за умов модельованої мікрогравітації

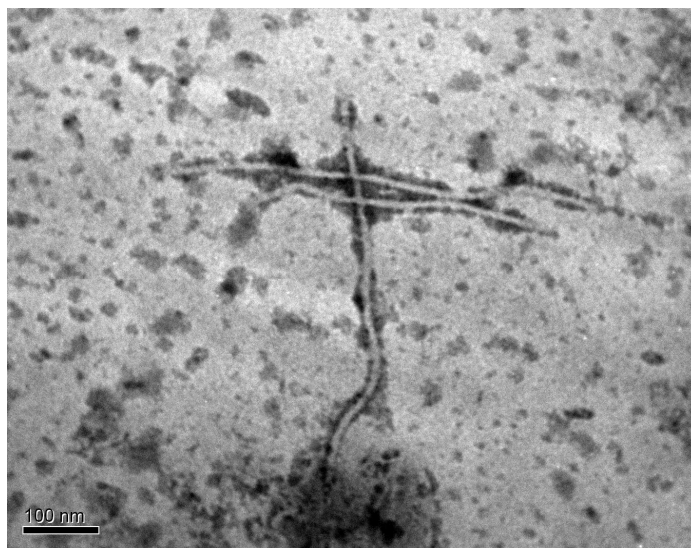


Рис. 3 Електронограма М-вірусу картоплі у контрольних рослинах помідорів, які не оброблялися рiстрегуляторами

У варіантах рослин, оброблених гідрогуматом, оптична щільність не відрізнялася від негативного контролю, що свідчить про відсутність МВК у

рослинах, які піддавалися сумісній дії модельованої мікрогравітації та цього рістрегулятора.

На 20-ту добу після інокуляції МВК був детектований у рослинах помідора, які не оброблялися регуляторами росту. Натомість у варіантах з обробкою вказаними речовинами вміст антигенів МВК знизився до рівня негативного контролю (рис. 2).

Отже, дослідження неспецифічної стійкості рослин помідора до МВК показало зниження вмісту антигенів МВК у рослинах помідорів, які піддавалися сумісній дії рістрегуляторів та тривалого кліноостатування, що може свідчити про індукцію захисних реакцій рослин та формування неспецифічної стійкості рослин помідора проти вірусної інфекції.

Скринінг сортів помідора, стійких проти МВК та УВК

Зважаючи на те, що характерним симптомом захворювання, спричиненого МВК і УВК, є скручування листків догори [5], для виявлення стійких сортів проводили пошук рослин без зазначених ознак хвороби. При обстеженні рослин в умовах Полтавської області у 2012-2013 рр. було виявлено 14 сортів помідора (Челнок, Рейнбоу, Джина, Консул, Сен-Пьер, Namadae, Рома, Коррида, Мікадо, Ліма, Космонавт Волков, Неаполь, Диана, Циган) без симптомів скручування листків, які використали для подальших досліджень.

Доведено, що МВК може спричиняти безсимптомну інфекцію на помідорі [4, 14], тому нами для виключення наявності МВК та УВК у сортів без візуальних симптомів захворювання, проводили ІФА. Аналіз показав, що усі досліджувані сорти були вільні від МВК та УВК.

Рослини досліджуваних сортів тестували також на наявність інших вірусів, поширених на помідорі в Україні: X-вірус картоплі, PVX; вірус тютюнової мозаїки, TMV; вірус огіркової мозаїки, CMV; вірус скручування листків картоплі, PLRV; вірус аспермії помідора, TAV; вірус плямистого в'янення помідора, TSWV. З'ясовано, що антигени PVX, TMV, CMV, PLRV, TAV, TSWV у рослинах відсутні.

Саме ці сорти відібрали для оцінки їх стійкості проти МВК та УВК. Дослідження проводили, використовуючи метод біотестування (механічна інокуляція рослин помідора по 10 шт кожного сорту МВК та УВК в лабораторних умовах) з подальшою перевіркою ІФА. Результати показали, що на чотирьох сортах (Диана, Неаполь, Космонавт Волков та Консул) симптоми вірусного захворювання не спостерігалися (таблиця).

Оцінка стійкості рослин помідора різних сортів, штучно уражених МВК та УВК

Сорт	Рослини із симптомами вірусного ураження, шт	
	Інокуляція МВК	Інокуляція УВК
Челнок		
Консул	0	0
Джина	0	5
Рейнбоу	0	5
Циган	0	9
Диана	0	0
Неаполь	0	0
Космонавт Волков	0	0
Ліма	0	7
Мікадо	6	2
Коррида	2	6
Рома	0	7
Namadae	0	6
Сен-Пьер	0	4
Маестро	8	0
Кримська сливка (позитивний контроль)	10	10

Результати біологічного тестування було підтверджено методом ІФА і доведено відсутність антигенів МВК та УВК штучно заражених рослинах помідора сортів Диана, Неаполь, Космонавт Волков та Консул цими вірусами.

Висновки

1. Уперше показано, що в умовах модельованої мікрогравітації відбувається накопичення антигенів МВК, що демонструє розвиток вірусної інфекції та активний перебіг реакцій у системі «М-вірус картоплі – помідор».
2. Дані щодо зниження вмісту антигенів вірусу у рослинах, які піддавалися дії рістрегуляторів за тривалішого кліностакування свідчать, що ці речовини індукували захисні реакції рослин. Адже рістрегулятори природного походження, якими є досліджувані нами оксидат торфу і гідрогумат, містять високу концентрацію фенольних сполук – компонентів вторинного метаболізму рослин, що можуть виступати в ролі активних факторів у формуванні неспецифічної стійкості рослин помідора проти вірусної інфекції.
3. Базуючись на багаторічних моніторингових дослідженнях, а також результатах біологічного тестування та ІФА, нами виокремлено чотири сорти помідора, стійких проти ураження МВК та УВК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко А. Л. Практикум із загальної вірусології. / А.Л. Бойко – К.: Видавничий центр “Київський університет”, 2000. – 269 с.
2. Вірусна природа скручування листків помідорів / [М. Д. Мельничук, Л. Т. Міщенко, А. А. Дуніч, І. О. Антіпов] // Карантин і захист рослин. – 2014. - № 2. – С. 1 – 4.
3. Вірусні інфекції картоплі та їх перебіг за умов модельованої мікрогравітації / [Л. Т. Міщенко, О. П. Таран, О. І. Гордейчик, В. П. Поліщук] // К.: Фітосоціоцентр, 2011. – 144 с
4. Властивості помідорних ізолятів М- та У-вірусів картоплі за умов Київської області / [О. І. Данілова, О. А. Кондратюк, О. В. Молчанець,

- Л. Т. Міщенко] // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія “Біологія”. – 2012. – № 60. – С. 30-32.
5. Властивості помідорних ізолятів М- та Y-вірусів картоплі / [Л. Т. Міщенко, А. А. Дуніч, О. І. Данілова, В. П. Поліщук] // Мікробіологічний журнал. - 2013. – Т.75, № 2. – С. 89-97.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – [3-е изд., перераб. и доп.]. – М.: Высшая школа, – 1980. – С. 293.
7. Міщенко Л. Т. Вірусні хвороби озимої пшениці / [Л. Т. Міщенко] // К.:Фітосоціоцентр, 2009. – 352 с.
8. Міщенко Л. Т. Вплив фітовірусів на якість продукції помідорів / [Л. Т. Міщенко, А. А. Дуніч, О. І. Данілова] // Зб. «Виробництво екологічно безпечної сільськогосподарської продукції: проблеми та перспективи». 10-11 жовтня 2013 р., Ніжин. – Ніжин, 2014. – С. 3-7.
9. Николаева О. В. Определение М- и S-вирусов картофеля методом иммуноферментного анализа / [О. В. Николаева, В. К. Новиков, В. Н. Каграманов] // Сельскохозяйственная биология. –1985. – № 2. – С. 96-101.
10. Новиков В. К. Метод получения Y – вируса картофеля и приготовления диагностических сывороток / [В. К. Новиков, И. Г. Атабеков] // Сельскохозяйственная биология. – 1982. – Т. 17, №5. – С. 705–711.
11. Патент на корисну модель № 19360 Україна, МПК51 A01G 1/00 A01H 4/00. Спосіб культивування біологічних об’єктів / [Л. Т. Міщенко, Л. І. Остапченко, І. А. Міщенко, С. В. Таран, Г. С. Янішевська, А. А. Коренєва, А. Л. Бойко]; власник Київський національний університет імені Тараса Шевченка. – № u 2006 06486; заявл. 13.06.06; опубл. 15.12.2006, Бюл. № 12.
12. Салига Ю. Т. Електронна мікроскопія біологічних об’єктів / Ю. Т. Салига, В. В. Снітинський // – Львів, 1999. – 152 с.
13. Clark M. F. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses / M. F. Clark, A. N. Adams // J. Gen. Virology. – 1977. – Vol. 34. – P. 574– 586.

14. Grieco F. Potato virus M in tomato crops in Southern Italy / [F. Grieco, D. Gallitelli, A. Franco] // Journal of Plant Pathology. – 1997. – **78**, N 1. - P. 45-49.
15. Mishchenko L. T. Dynamic of WSMV Reproduction in the Apogee Wheat Variety under Simulated Microgravity Conditions / L. T. Mishchenko // Journal of Gravitational Physiology. – 2003. – Vol. 10, № 1. – P. 27–28.
16. Mishchenko L. T. Influence Of Simulated Microgravity on Physiological Reactions in Healthy and Virus Infected Wheat Plants of Different Varieties / [L. T. Mishchenko] // Journal of Gravitational Physiology. – 2003. –Vol. 9, № 1. – P. 225–226.
17. The effects of clinorotation on the process of viral infection in potato plants / [L. T. Mishchenko, N. Y. Taran, I. A. Mishchenko [et al.]] // Journal of Gravitational Physiology. – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 119– 120.

**ИССЛЕДОВАНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ СТОЙКОСТИ
РАСТЕНИЙ ПОМИДОРА К М- И Y-ВИРУСАМ КАРТОФЕЛЯ
О.И. ДАНИЛОВА**

Установлено снижение концентрации антигенов МВК в растениях помидора, которые подвергались совместному действию регуляторов роста природного происхождения и длительного клинотатирования, что свидетельствует об индукции защитных реакций растений и формировании неспецифической стойкости помидора к вирусной инфекции. На основании проведенных исследований выделено четыре сорта помидоров, стойких к заражению М- и Y-вирусами картофеля.

Ключевые слова: *М-вирус картофеля, Y-вирус картофеля, неспецифическая стойкость, моделированная микрогравитация, регуляторы роста растений.*

**INVESTIGATION OF NONSPECIFIC RESISTANCE OF TOMATO
PLANTS TO POTATO VIRUS M AND POTATO VIRUS Y
DANILOVA O.I.**

It was investigated decreasing of concentration of PVM antigens in tomato plants under common effect of plant growing regulators and clinorotation. It is testifies to

induction of protective reactions of plants and forming of nonspecific resistance of tomatoes to the viral infection. On the basis of the conducted research four tomatoes varieties were selected as resistant to Potato virus M and Potato virus Y.

Keywords: Potato virus M, Potato virus Y, nonspecific resistance, simulated microgravity, plant growing regulators.