УДК 633.812.754: 578.083

Манушкіна Т.М., Манушкін М.М.

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ХВОРОБ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. В АГРОЦЕНОЗАХ КРИМУ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ ОЗДОРОВЛЕНОГО ПОСАДКОВОГО МАТЕРІАЛУ

Підібрані режими та проведене порівняльне вивчення ефективності прийомів оздоровлення культури апікальних меристем, термотерапії in vitro і хемотерапії для звільнення рослин лаванди від вірусу некротичної плямистості бальзаміну (INSV). Розроблено біотехнологічну схему одержання оздоровленого посадкового матеріалу лаванди.

Ключові слова: *агроценози, апікальні меристеми, рослини лаванди, вірус плямистості бальзаміну (INSV).*

Подобраны режимы и проведено сравнительное изучение эффективности приемов оздоровления культуры апикальных меристем, термотерапии in vitro и хемотерапии для освобождения растений лаванды от вируса некротической пятнистости бальзамина (INSV). Разработана биотехнологическая схема получения оздоровленного посадочного материала лаванды.

Ключевые слова: *агроценозы, апикальные меристемы, растения лаванды, вирус некротической пятнистости бальзамина (INSV).*

The comparative study of efficiency of techniques of improvement of apical meristems culture, thermotherapy in vitro and chemotherapy for clearing plants of lavender of the Impatiens necrotic spot virus (INSV) is conducted. The biotechnological scheme of getting of the improved sowing material of lavender is developed.

Key words: *agrocoenosis, apical meristems, plants of lavender, the Impatiens necrotic spot virus (INSV).*

Вступ та аналіз літератури. Лаванда є пріоритетною ефіроолійною культурою в Україні. При створенні агроекосистем має важливе екологічне значення як найбільш ефективна протиерозійна рослина та краща культура для вирощування на рекультивованих землях і недостатньо родючих, щебенистих ґрунтах, де інші культури дають низькі урожаї [1].

Перші фітопатологи, які працювали з лавандою, вважали, що ця культура є стійкою до ураження хворобами [2]. Сучасний стан вивченності цього питання показує, що рослини лаванди уражуються інфекційними агентами різної етіології: грибної, мікоплазменної, вірусної.

На початку 70-х років XX століття відмічено ураження лаванди септоріозом (плямистістю) у країнах Західної Європи, на Кавказі, у Молдавії та Криму [3]. Збудником септоріозу є гриб *Septoria lavandulae* Desm. (клас *Fungi imperfecti*) [4]. Симптоми захворювання проявляються восени на верхній стороні старих листків у вигляді округлих білих плям. Пізніше плями засихають, оточені червоною каймою, на поверхні якої розвиваються чорно-коричневі пікніди, заповнені конідіями. Рослини лаванди, уражені септоріозом, відстають у рості, передчасно скидають листя, що призводить до зниження урожаю, а також вмісту і якості ефірної олії. Так, в результаті ураження септоріозом сортів Степова і Рекорд урожай суцвіть знижувався на 26 %, а в ефірній олії містилося менше складних ефірів і більше вуглеводнів, ніж в олії зі здорових рослин, що погіршувало її якість. Інтенсивність розвитку септоріозу неоднакова по районах вирощування: у Білогірському і Сімферопольському

районах вона складає 24-30 %, у Алуштинському і Бахчисарайському близько 18 % [5].

Фомоз стебел (збудник *Phoma lavandulae*) проявляється в пожовтінні молодих пагонів, що згодом всихають і приймають коричнево-сірий колір. Епідерміс на стеблах в місцях ураження розтріскується, під епідермісом виявляються пікніди. Кущі пригнічуються, часто гинуть повністю [6].

Кореневі гнилі зусрічаються на лаванді повсюдно [6]. Збудниками кореневих гнилей лаванди є гриби родів *Fusarium, Pythium, Phytophthora, Armillaria* [7]. Значних економічних збитків розсадництву лаванди завдає гриб *Fusarium oxysporum* Schlecht (клас *Fungi imperfecti*) – збудник фузаріозної гнилі, що уражує живці та саджанці. Звичайно збудник грибної хвороби виявляється одночасно з галовими нематодами *Meloidogyne hapla* Chitwood і *Meloidogyne arenaria* (Neal). Нематоди утворюють на коренях гали від 0,5 до 3-5 мм, які ускладнюють рух води і надходження поживних речовин до рослини. Уражені рослини відстають в рості, в'януть, у них розвивається хлороз, відмирають корені, що сприяє проникненню грибів роду *Fusarium* в тканини рослин-господарів [7]. За даними співробітників Інституту ефіроолійних і лікарських рослин УААН [8], розповсюдженість ураження кореневої системи лаванди галовою нематодою досягає 80-100 %, а основним джерелом інфекції на плантаціях є заражені саджанці. У результаті вивчення фауни нематод на лаванді виявлено їх значне різноманіття: 23 види з чотирьох екологічних груп, з них 8 видів – типові паразити рослин, що викликають специфічні фітогельмінтози. Відмічена тенденція до зниження урожаю суцвіть з рослин, заселених нематодами.

У 1986 році на лаванді в Молдавії зареєстрована нова хвороба – мікоплазмене всихання [9]. Доказано, що патологічний процес носить інфекційний характер, і хворобу віднесено до групи захворювань жовтяниці рослин, збудниками яких є мікоплазми (клас *Molicutes*). Мікоплазми уражують флоему і флоемну паренхіму, що призводить до накопичення продуктів фотосинтезу в листках, вони жовтіють і скручуються. Ускладнюється відтік поживних речовин у запасальні органи, внаслідок чого у хворих рослин знижується стійкість до низьких температур, вони поступово всихають. Всиханню лаванди передують такі симптоми: жовтий хлороз, карликовість, виродження, скручування листків, філоїдія квіток. Продуктивність плантації різко знижується на 6-7 рік культивування.

У Криму ознаки захворювання на плантаціях з'явились на початку 90-х років XX століття [10]. Симптоми хвороби проявляються під час цвітіння і після збору урожаю. Листки і пагони зверху жовтіють, що стає помітним на початку липня і до кінця вересня. Уражені рослини відстають у рості, всихають. Хвороба носить локальний характер, рослини випадають окремими куртинами. Зустрічаються також інші типи ураження: виродження, скручування верхівкових листків у фазу бутонізації. Зроблено припущення, що, крім мікоплазм, збудниками хвороби також можуть бути віруси або вірусомікоплазменні асоціації. Аналіз соку рослин і очищеного препарату вірусу показав наявність палочковидних, нитевидних і ізометричних часточок.

Перше повідомлення про уражуваність рослин роду *Lavandula* L. вірусами зроблене в 1972 році італійськими вченими L. Giunchedi і M. Molinas de Ferrer, які виділили з лавандину вірус мозаїки люцерни [11]. У 1974 році аналогічні результати були опубліковані французькими дослідниками G. Marchoux і J. Rougier [12].

В екологічних умовах Криму шкодочинність вірусних хвороб лаванди надзвичайно висока [10; 13]. Розповсюдженість рослин з вірусними симптомами на промислових плантаціях досягає 16-86 %, а в окремі роки розвиток вірусних захворювань лаванди приймає епіфітотійний характер [8].

Детальне обстеження ураженості рослин лаванди в селекційних та промислових господарствах Кримського регіону проведене Н.А. Сенчуговою [13]. Автор вказує на те, що інфекційна ситуація на плантаціях лаванди призвела до загибелі цілих ділянок промислових насаджень. Найгірший фітосанітарний стан спостерігається у двох районах вирощування лаванди – Білогірському та Бахчисарайському, де розповсюдженість симптомів досягає 86 % і 62 % відповідно.

Віруси зумовлюють у рослин лаванди патологічні зміни: жовтяниці, скручування верхівок пагонів, виродження, всихання кущів [10; 13]. Наслідком таких патологій є зниження урожайності цієї культури, у хворих рослин на другий рік вирощування кількість і маса суцвіть зменшується майже вдвічі, кількість квіток у суцвітті – на 37 %, рослини всихають через 2-3 роки культивування, а також погіршується якість ефірної олії.

Електронно-мікроскопічні дослідження соку з листків лаванди показали, що в зразках із симптомами всихання і скручування верхівок були наявні вірусні часточки ниткоподібної та сферичної форми, а в зразках із симптомами жовтяниці були виявлені ниткоподібні вірусні часточки [13]. При тестуванні рослин лаванди методом ІФА була зареєстрована позитивна реакція з антисироватками до таких вірусів: мозаїки люцерни, слабкого пожовтіння буряків, Х-вірусу картоплі, огіркової мозаїки, тютюнової мозаїки, смугастої мозаїки пшениці і жовтої карликовості ячменю. Результати аналізу свідчать про те, що прояв симптомів на лаванді викликається змішаною інфекцією вірусів, споріднених з поті-, лютео-, кукумо-, альфамо- і тобамовірусами.

Основними переносниками вірусної інфекції визначені цикадки *Lepironia coleoptrata* L. і *Agalmatium bilobum* Fieb. [10], які є головними шкідниками лаванди в Криму.

Значна кількість патогенів лаванди, їх широка розповсюдженість та шкодочинність зумовлюють необхідність розробки прийомів виробництва оздоровлених саджанців цієї культури задля запобігання потрапляння інфекції на промислові плантації з посадковим матеріалом. Метою даної роботи було підібрати ефективні умови терапевт-

тичних біотехнологічних прийомів культури апікальних меристем, термотерапії *in vitro*, хемотерапії для звільнення від вірусної інфекції рослин лаванди.

Матеріали і методи. Для дослідів відбирали рослини лаванди *Lavandula angustifolia* Mill. без зовнішніх симптомів інфекційних хвороб. З метою виявлення латентної вірусної інфекції донорні рослини тестували методами біотесту на рослинах-індикаторах та імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA) в непрямій (indirect ELISA) та сендвіч (DAS-ELISA) модифікаціях на 96-лункових полістиролових планшетах («Labsystems», Фінляндія). Результати реєстрували на автоматичному ELISA-рідері «Dynex Technologies» при довжині хвилі 405 нм. За позитивний результат приймали показник екстинції, що перевищував показник негативного контролю в 2 рази. Для статистичної достовірності кожен зразок аналізували в 3-кратній повторності.

У дослідах з оздоровлення рослин лаванди як експланти культивували апікальні меристеми розміром 0,2, 0,7 і 1,0 мм. Культивували ізольовані меристеми на живильному середовищі МС, доповненому кінетином (1,0 мг/л) і ГК (1,0 мг/л). Термотерапії в умовах *in vitro* піддавали мікропагони (неукоріненні мікророслини) та мікророслини другого пасажу. Режим термотерапії: температура 37±1 ºС, освітленість 2-3 клк/м^2, фотоперіод 16 годин, відносна вологість повітря 60-70 %. У дослідах з хемотерапії використовували віразол (рібавірін, 1 -β-D-рибофуранозіл-1,2,4-триазол-3-карбоксамід, «Sigma», Німеччина). Препарат додавали до живильного середовища МС, доповненого кінетином (1,0 мг/л) і гібереловою кислотою (1,0 мг/л), в концентраціях 5,0, 10,0, 20,0 і 30,0 мг/л. На середовищах з віразолом культивували меристеми розміром 0,7 мм. Усі експерименти ставили у двократній повторності, об'єм вибірки становив 20 рослин.

Результати та обговорення. Звільнення рослин від грибної інфекції та нематод відбувається при клональному мікророзмноженні за рахунок використання експланту невеликого розміру, його поверхової стерилізації та культивування в асептичних умовах [14]. Більш складним є процес оздоровлення рослин від мікоплазм, і особливо від вірусів, оскільки клітина перетворюється в однорідну систему з вірусом, а її органели беруть участь у біосинтезі вірусних часточок [15].

Традиційно система одержання оздоровленого посадкового матеріалу включає чотири етапи:

1) відбір і тестування рослин-донорів на наявність вірусної інфекції;

2) терапія хворих рослин з використанням прийомів культури апікальних меристем, термотерапії, хемотерапії;

3) тестування оздоровлених рослин на наявність вірусної інфекції;

4) розмноження безвірусних рослин та створення маточників суперсупереліти, супереліти і еліти в умовах, що виключають реінфекцію.

Ефективність прийомів оздоровлення рослин від вірусів залежить від комплексно пов'язаних факторів: генотипу рослини, біології патогену, взаємовідносин рослина-вірус, умов культивування, методів вірусологічного контролю. Генотип рослини впливає на процес оздоровлення через різну сприйнятливість до вірусних інфекцій, специфічну будову і розмір вільної від вірусних часточок зони апікальної меристеми, морфогенетичні потенції ізольованих меристем, термотолерантність, стійкість до дії віроцидів [14]. Від біології вірусу залежить швидкість його репродукції та переміщення по рослині, здатність проникати в зону апікальної меристеми, заражати рослину і розмножуватися в ній при температурі 36 ºС, чутливість до віроцидів [15]. Під час оздоровлення необхідно створити «компромісні» умови культивування, щоб зберегти життєздатність рослини і блокувати репродукцію вірусу, що є складним через тісний зв'язок господар-паразит. Важливим фактором в системі оздоровлення рослин є також чутливість методів вірусологічного контролю, оскільки під час терапії репродукція вірусів пригнічується, але вони можуть залишатися в рослині в низькій концентрації.

У наших дослідженнях проведене порівняльне вивчення прийомів оздоровлення культури апікальних меристем, термотерапії *in vitro* і хемотерапії на модельній системі лаванда-INSV. У результаті проведених досліджень і аналізу літературних даних з питання біотехнологічних прийомів оздоровлення рослин розроблена біотехнологічна схема одержання оздоровленого посадкового матеріалу лаванди (рис. 1).

Встановлено, що при оздоровленні рослин лаванди методом культури апікальних меристем як експланти доцільно використовувати меристеми розміром 0,2 мм, які володіють високою регенераційною здатністю – 87,5-100,0 %. Вихід здорових рослин становить у сорту Синєва – 80,0 %, у сорту Степова – 100,0 %.

Підбір умов для проведення термотерапії *in vitro* лаванди дозволив визначити, що найбільш оптимальною є температура – 37±1 С, експозиція обробки – 10 діб, фотоперіод – 16 годин. Кращим рослинним матеріалом є укорінені мікророслини другого пасажу, які при вказаному режимі зберігають життєздатність на рівні 100,0 %, приріст пагонів становить 25,25-18,02 мм. З відрослих пагонів ізолювали верхівкові бруньки висотою 3-5 мм і культивували на середовищі МС. Приживлюваність бруньок досягала 100,0 % і відбувалося множинне пагоноутворення. Ефективність оздоровлення складала 70,0 % у сорті Синєва і 100,0 % у сорті Степова.

Показано, що найбільш прийнятним способом хемотерапії є культивування меристем на середовищі МС, доповненому віразолом у концентрації 20,0 мг/л, протягом 30 днів, який забезпечує одержання 80,0 % безвірусних рослин.

Порівняльний аналіз прийомів терапії з врахуванням виходу безвірусних рослин, матеріальних і трудових затрат, дії абіотичних факторів на рослини-регенеранти показує, що найбільш ефективним методом оздоровлення рослин лаванди від INSV є культура апікальних меристем розміром 0,2 мм. Підібрані режими термотерапії *in vitro* і хемотерапії можуть бути застосовані для оздоровлення лаванди, ураженої вірусами, від яких неможливо звільнитися методом культури апікальних меристем.

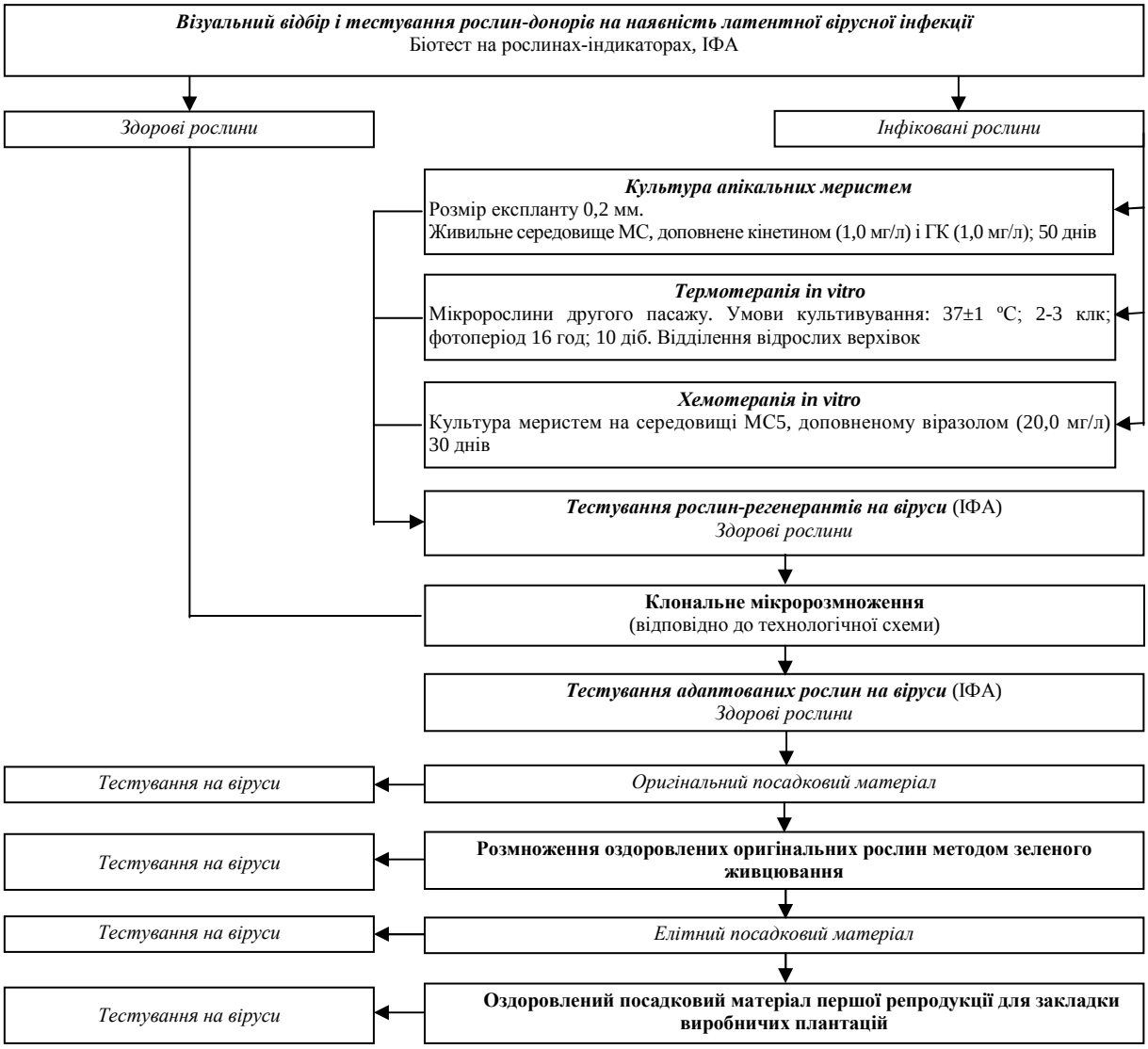

Рис. 1. Біотехнологічна схема одержання оздоровленого посадкового матеріалу лаванди

Безвірусні рослини відносять до категорії оригінальний посадковий матеріал та використовують для закладки маточнику в умовах закритого ґрунту при повній ізоляції від можливих джерел інфікування вірусами. Розмноження оригінальних маточних рослин і одержання елітного посадкового матеріалу доцільно проводити методом зеленого живцювання. Вихід зелених живців з однорічних меристемних рослин складає у сорті Синєва 36,00 шт, у сорті Степова 88,66 шт. Укорінюваність живців становить 82,81-98,43 %, а застосування обробки їх водними розчинами ІМК (25,0 мг/л) та ІОК (100,0 мг/л) оптимізує розвиток кореневої системи саджанців. На кожному з етапів розмноження рослин необхідно проводити вірусологічний контроль для виключення можливості реінфекції.

Висновки

1. Показано значне розповсюдження в екологічних умовах Криму інфекційних хвороб *Lavandula angustifolia* Mill. різної етіології – грибної (септоріоз, фомоз стебел, кореневі гнилі), мікоплазменної (жовтяниця), вірусної та ураження галовими нематодами.

2. Розроблено біотехнологічну схему одержання оздоровленого посадкового матеріалу лаванди.

ЛІТЕРАТУРА

1. Эфиромасличное производство / Л.А. Бугаенко, Л.Г. Назаренко, Л.П. Савчук и др. // Научное обоснование основных направлений развития агропромышленного комплекса Крыма в условиях рыночного производства. – Симферополь: Таврия, 2004. – С. 64-79.
2. Масалай Б.А. Болезни лаванды и меры борьбы с ними // Труды по лекарственным и лекарственно-техническим растениям. – Симферополь, 1934. – № 72. – С. 133-142.
3. Жукова Л.М. Резерв увеличения производства эфирного масла лаванды // Эфиромасличная промышленность. – М., 1975. – Вып. 4. – С. 1-5.

4. Романенко Л.Г., Жукова Л.М. Наследуемость устойчивости к септориозу межсортовыми гибридами лаванды // Труды ВНИИЭМК. – Симферополь. – 1975. – Т.VIII. – С. 35-37.
5. Чумак В.А., Ковалева В.Ф., Петров А.С. Фитосанитарная обстановка на плантациях эфиромасличных культур в Крыму в 1986-1990 гг. // Селекция, технология возделывания и переработки эфиромасличных культур. – Симферополь, 1992. – Т. XXIII. – С. 58-65.
6. Буюкли М. Лаванда и ее культура в СССР. – Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1969. – 327 с.
7. Митрофанов В.И., Работягов В.Д., Самойлов Ю.К.. Азарова Э.Ф., Аксенов Ю.В. Лаванда: элитное питомниководство. – Ялта: НБС-ННЦ. – 2005. – 60 с.
8. Изучить закономерности формирования комплекса вредных организмов, вызывающих усыхание лаванды, и разработать технологию по оздоровлению посадочного материала от вирусных, нематодных и грибных болезней: Отчет о НИР / Институт эфиромасличных и лекарственных растений. – Симферополь, 1996. – С. 130-154.
9. Гавришин Ю.А., Коев Г.В., Игнатова З.К. Борьба с усыханием – резерв повышения урожайности лаванды настоящей // Исследования по селекции, семеноводству и технологии возделывания эфироносов. – Кишинев: Штиинца, 1988. – С. 67-70.
10. Чумак В.А., Подмарькова Н.М., Сенчугова Н.А. Вирусные болезни лаванды и пути оздоровления посадочного материала // Сб. трудов ИЭЛР. – Т. XXIII. – Симферополь, 1992. – С. 48-54.
11. Giunchedi L., De Ferrer M.M. Un ceppo di virus del mosaico dell'Erba medica isolato da *Lavandula latifolia* x *L. officinalis* // Phytopathol. mediterr. – 1972. – Vol. 11. – № 1. – P. 74-76.
12. Marchoux G., Rougier J. Virus de la mosaique de la luzerne: isolement a partir du lavandin (*Lavandula hybrida* Rev.) et de l'aubergine (*Solanum melongena* L.) // Annales de phytopathologie. – 1974. – V. 6. – № 2. – P. 191-194.
13. Сенчугова Н.А. Вірусні хвороби основних ефіроолійних культур Кримського регіону: Автореф. дис… канд. біол. наук: 03.00.06 / КНУ ім. Тараса Шевченка. – К., 2003. – 21 с.
14. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
15. Мэтьюз Р. Вирусы растений: Пер. с англ. – М.: Мир, 1973. – 600 с.

Рецензенти: Самойленко Г.Г., к.б.н., доцент;
Шахова Н.М., к.б.н.

© Манушкіна Т.М., Манушкін М.М., 2010

Стаття надійшла до редколегії 09.01.2010 р.