

**УДК 633.812.754: 578.083**

## **ТЕРМОТЕРАПІЯ IN VITRO РОСЛИН *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.**

*Манушкіна Т.М.<sup>1</sup>, Бугаєнко Л.О.<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>*Миколаївський державний аграрний університет, Миколаїв, Україна*

<sup>2</sup>*РВНЗ «Кримський інженерно-педагогічний університет», Сімферополь, Україна*

*E-mail: latushkina2004@mail.ru*

Підбрано режим та проведено вивчення ефективності термотерапії *in vitro* для звільнення рослин лаванди від вірусу некротичної плямистості бальзаміну (INSV).

**Ключові слова:** лаванда, віруси, термотерапія *in vitro*.

### **ВСТУП**

Лаванда – пріоритетна ефіроолійна культура, а також має важливе екологічне значення, оскільки є ефективною протиерозійною рослиною і кращою культурою для вирощування на рекультивованих землях [1].

На сьогодні однією з основних причин зменшення продуктивності промислових насаджень лаванди є значна ураженість рослин інфекційними хворобами різної етіології - грибною (септоріоз, фомоз стебел, кореневі гнилі), мікоплазменної (жовтяниця), вірусної та галовими нематодами. Ефективність культивування плантацій, заражених патогенами, знижується внаслідок втрат врожаю суцвіть, які досягають 26-50%, погіршення якості ефірної олії, виродження та загибелі окремих кущів або цілих ділянок [2]. Оскільки лаванда є багаторічною рослиною, відбувається накопичення патогенів в агроценозах з кожним роком культивування та їх поширення при вегетативному розмноженні. Вказаний процес загрожує стійкому існуванню агроєкосистем, тому постає необхідність розробки прийомів оздоровлення посадкового матеріалу лаванди.

На сьогодні головними способами одержання безвірусних рослин є відбір і розмноження здорових маточних рослин на основі ранньої і точної діагностики та біотехнологічні прийоми оздоровлення посадкового матеріалу. У випадку, коли всі рослини цінного сорту або селекційної форми заражені вірусами, для їх оздоровлення залучають біотехнологічні методи: культуру апікальних меристем, термотерапію і хемотерапію [3].

Термотерапія – це обеззаражування рослин від вірусів під дією підвищених температур (найчастіше 36–42 °С). Механізм терапевтичного ефекту вивчений недостатньо, і може бути пояснений декількома гіпотезами [4]:

1) висока температура призводить до втрати інфекційності вірусних часточок, викликаючи деструкцію їх нуклеїнової кислоти або білкової оболонки (у термолабільних вірусів);

2) висока температура діє на віруси через метаболізм рослини, викликаючи дисбаланс між синтезом і деградацією вірусних часточок в сторону деградації;

3) під дією високих температур зростає інгібуюча активність клітин рослини-господаря;

4) під дією підвищених температур відбувається денатурація білкових вірусних рецепторів клітини, які беруть участь в початкових етапах інфекційного процесу, і клітини втрачають сприйнятливості до вірусу. Так, J.H. Wu і I. Rappaport було показано, що вірусні рецептори рослин швидко інактивувались при нагріванні, тоді як інтактний ВТМ і інфекційна РНК ВТМ залишались стабільними [цит. по 5].

Термотерапія *in vitro* застосовується для рослин, які характеризуються низькою термотолерантністю [6]. Ефективність такого способу звільнення від вірусів показана для троянди, цимбідіуму – 80 % [6], вишні і сливи – 100 % [7] та інших культур.

Метою досліджень було підібрати ефективні умови термотерапії *in vitro* та вивчити їх вплив на регенерацію і звільнення від вірусної інфекції рослин лаванди.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для проведення досліджень служили рослини лаванди вузьколистої *L. angustifolia* Mill. сортів Степова і Синєва.

Тестування вихідних рослин і рослин після терапії проводили методом імуноферментного аналізу (ІФА, ELISA) в непрямій (indirect ELISA) та сендвіч (DAS-ELISA) модифікаціях [8] на 96-лункових полістиролових планшетах ("Labsystems", Фінляндія). Для аналізу відбирали наважку листків 1 г і гомогенізували в 3 мл фосфатного буферного розчину (ФБР) (0,1 моль/л) у співвідношенні 1:5 (маса: об'єм). Гомогенат центрифугували за 5000 об/хв. впродовж 15 хв., для аналізу використовували надосад. Рослинні екстракти наносили в карбонатному буфері у співвідношенні 1:1 (об'єм: об'єм). У роботі використовували кролячі поліклональні антитіла, специфічні до вірусу тютюнової мозаїки (TMV, Tobamovirus), вірусу мозаїки люцерни (AMV, Alfamovirus), вірусу огіркової мозаїки (CMV, Cucumovirus), X-вірусу картоплі (PVX, Potexvirus), вірусу брязкотіння табаку (TRV, Tobravirus), вірусу жовтої карликовості ячменю (BYDV, Luteovirus), вірусу полосатої мозаїки пшениці (WSMV, Potyvirus), вірусу некротичної плямистості бальзаміну (INSV, Tospovirus). В непрямому ІФА застосовували антивидові антитіла, мічені лужною фосфатазою ("Sigma", Німеччина). Проявляли реакцію буфером із субстратом (N-п-нітрофенілфосфат) в концентрації 1,0 мг/мл, а зупиняли 3М NaOH. 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.

Термотерапії в умовах *in vitro* [3] піддавали мікропагони (неукоріненні мікророслини) та мікророслини другого пасажу, які культивували при температурі 25-26 °С на середовищах МС5 і МС18 протягом 30 діб. За цей час формувалися пагони висотою 15-20 мм. Перед початком термообробки проводили акліматизацію

дослідних рослин, які поміщали в термокамеру з температурою 25 °С, підвищували її щоденно на 2 °С впродовж тижня і доводили до 37±1 °С. Режим термотерапії: температура 37±1 °С, освітленість 2–3 клк/м<sup>2</sup>, фотоперіод 16 годин, відносна вологість повітря 60–70 %. Температуру в термокамері контролювали за допомогою тижневого термографа Т-10. Контролем служили мікропагони і мікророслини, що культивували при температурі 25–26 °С. Життєздатність пагонів визначали як відношення кількості життєздатних пагонів до загальної кількості пагонів, що піддавалися термообробці, виражене у відсотках. Облік проводили з 2-го по 20-й день термообробки. Всі експерименти ставили в двократній повторності, об'єм вибірки становив 20 рослин.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Для оздоровлення рослин лаванди вивчали можливість проведення термотерапії *in vitro*. В дослідженнях вивчали вплив підвищеної температури 37±1 °С на ріст і розвиток мікророслин лаванди та елімінацію вірусів. Така температура є стресовою для рослин, оскільки пороговою температурою переходу від сприятливих до несприятливих умов життєдіяльності є температура 35 °С. У рослин при перевищенні оптимального температурного рівня відбувається дезорганізація багатьох функцій клітини, зниження швидкості різних фізіологічних процесів [9], а при рекомендованій для термообробки температурі 38 °С відмічається лізис ядер у 5,3 % клітин, кількість клітин, які проходять процес мітотичного поділу, становить 14,3 %, тоді як при температурі 20 °С мітоз відмічається у всіх клітин [10].

Основним завданням при постановці експерименту з термотерапії *in vitro* лаванди було визначити температурний режим, при якому зберігається життєздатність верхівкових бруньок, забезпечується найбільший приріст мікропагонів і відбувається елімінація вірусів.

Для досліджень відбирали рослини без зовнішніх симптомів інфекційних хвороб. З метою виявлення латентної вірусної інфекції донорні рослини тестували методом імуноферментного аналізу. Дані ІФА показали, що дослідні зразки містять антигени INSV, при чому показник екстинції сорту Синева ( $E_{405}=0,613$  опт. од.) був вищим, порівняно із сортом Степова ( $E_{405}=0,445$  опт. од.). Показник екстинції рослинних екстрактів з сироватками, специфічними до TMV, AMV, TRV, WSMV, BYDV, CMV і PVX, перебував на рівні негативного контролю.

INSV – *Impatiens necrotic spot virus*, вірус некротичної плямистості бальзаміну, належить до родини *Tospovirus*, роду *Bunyaviridae* [11]. Вперше виявлений на бальзаміні в США в 1990 році Law M.D. і Moyet J.W. [12]. Розповсюджений в Бельгії, Німеччині, Нідерландах, Польщі, Великобританії, США, Грузії [12]. Уражує рослини з 60 родин [12], в тому числі з родини *Lamiaceae* – *Lamium*, *Lavandula*, *Melissa*, *Mentha*, *Salvia*.

Аналіз життєздатності рослин лаванди в період термотерапії показав, що цей показник залежить від експозиції термообробки, генотипу і типу досліджуваного матеріалу (рис. 1). Зниження життєздатності пагонів відбувалося на 6-8-й день термообробки, коли відмічали загибель 14,3-33,3 % верхівкових бруньок. Виключенням були мікророслини сорту Синева, у яких життєздатність пагонів на

## ТЕРМОТЕРАПІЯ IN VITRO РОСЛИН LAVANDULA ANGUSTIFOLIA MILL....

рівні 100 % зберігалася до 10-го дня культивування. Різне зниження життєздатності пагонів до 57,1-33,3 % відмічалася у обох сортів на 12-й день культивування в умовах підвищеної температури, а на 16-20-й день кількість життєздатних верхівкових бруньок у мікророслин складала 42,9-6,7 %, і відмічалася повна загибель мікропагонів.

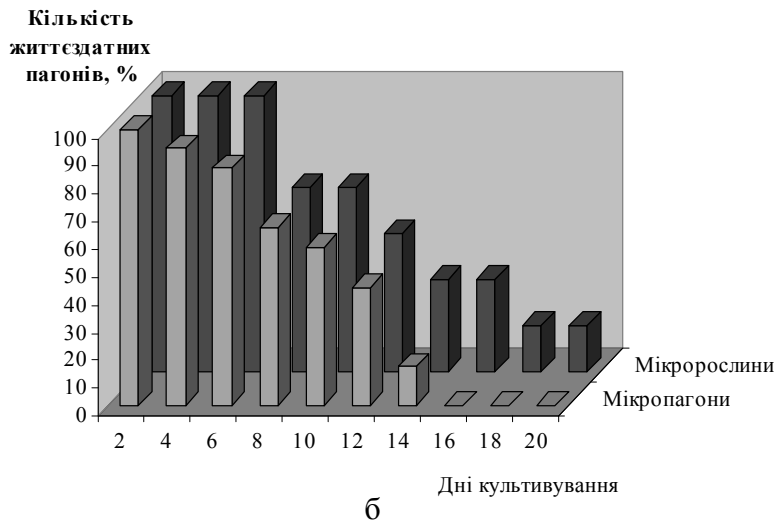
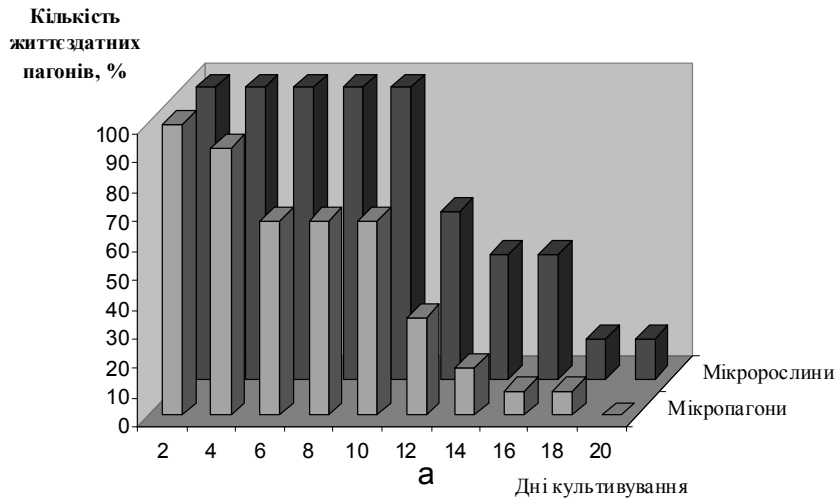


Рис. 1 Життєздатність пагонів лаванди сортів Синева (а) і Степова (б) в умовах термотерапії *in vitro*

Отже, оптимальною експозицією термообробки рослин лаванди в умовах *in vitro* є 10 діб, протягом яких зберігається життєздатність пагонів на рівні 57,1-

100,0 %. При чому, термотолерантність і інтенсивність росту рослин залежали від генотипу і типу досліджуваного матеріалу (табл. 1).

**Таблиця 1**  
**Вплив термообробки на розвиток меристемних рослин лаванди *in vitro***

Сорт	Тип досліджуваного матеріалу	Варіант досліджу	Кількість життєздатних пагонів, %	Приріст за 10 днів культивування	
				висоти пагонів, мм	пар листків, шт.
Синєва	мікропагони	контроль	100,00	11,50 ± 1,50	3,00 ± 0,00
		термообробка	66,67	12,08 ± 1,44	1,00 ± 0,00
	мікророслини	контроль	100,00	10,75 ± 2,84	2,00 ± 0,00
		термообробка	100,00	11,43 ± 1,85	1,00 ± 0,00
Степова	мікропагони	контроль	100,00	22,50 ± 1,50	2,25 ± 0,48
		термообробка	57,14	25,25 ± 3,09	1,50 ± 0,19
	мікророслини	контроль	100,00	20,00 ± 2,18	3,50 ± 0,50
		термообробка	66,67	19,67 ± 2,10	1,00 ± 0,00**

Примітка: Різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна при \*\*P=0,01.

Показано, що життєздатність верхівкових бруньок мікророслин була вищою в порівнянні з мікропагонами у обох сортів. У сорту Синєва за 10 днів культивування в умовах підвищеної температури життєздатність зберегли 100,0 % верхівкових бруньок, а у мікропагонів – 66,7 %. Термотолерантність рослин сорту Степова була нижчою у порівнянні з сортом Синєва – життєздатність мікророслин склала 66,7%, мікропагонів – 57,1%. Приріст пагонів дослідних рослин суттєво не відрізнявся від контрольних, а також між мікропагонами і мікророслинами одного генотипу. Однак, спостерігалися суттєві відмінності за цим показником між сортами, які досліджували, як в контрольних, так і в дослідних варіантах. У сорту Степова приріст був в 1,7-2,1 рази більший у порівнянні з сортом Синєва. За період термообробки у дослідних рослин сформувалася одна пара листків, а в контролі – дві-чотири пари листків. Можливо, при температурі 37±1 °C не відбувалося значного пригнічення росту клітин розтягуванням, внаслідок чого приріст пагонів не відрізнявся у дослідних і контрольних рослин, але, ймовірно, в цих умовах збільшувався інтервал між закладенням двох листкових зачатків (пластохрон), що обумовлювало зменшення кількості листків на пагоні в 2-4 рази у порівнянні з контролем. Таким чином, кращим рослинним матеріалом для проведення термотерапії лаванди *in vitro* є мікророслини, життєздатність яких при підвищеній температурі вища на 33,3 % у сорту Синєва, і на 9,6 % у сорту Степова ніж у мікропагонів, а довжина приросту пагонів не відрізняється між типами досліджуваного матеріалу.

З метою зменшення ризику потрапляння вірусних часточок у відрослі протягом термотерапії частини пагонів для субкультивування використовували не весь приріст, а лише верхівкові бруньки висотою 3-5 мм, тобто верхівки пагонів у 2-

7 разів менші ніж довжина приросту. Верхівкові бруньки ізолювали відразу після зняття температурного стресу і культивували на живильному середовищі МС5 (табл. 2).

**Таблиця 2**

**Розвиток ізолюваних верхівкових бруньок лаванди в культурі *in vitro*  
(50 діб культивування)**

Біометричні параметри	Сорт Синєва		Сорт Степова	
	контроль (без термо-обробки)	після термо-обробки	контроль (без термо-обробки)	після термо-обробки
Частота регенерації, %	100,0	100,0	100,0	100,0
Висота основного пагону, мм	21,42 ± 1,41	23,25 ± 3,01	44,20 ± 2,89	47,00 ± 5,43
Кількість пар листків, шт.	4,74 ± 0,44	5,50 ± 0,48	6,90 ± 0,54	7,50 ± 0,29
Частота множинного пагоноутворення, %	100,0	100,0	70,0	60,0
Кількість додаткових пагонів, шт.	3,42 ± 0,34	6,75±0,48***	1,36 ± 0,13	3,67± 0,67**
Коефіцієнт розмноження	1 : 8,16	1 : 12,25	1 : 7,85	1 : 9,70

*Примітка:* різниця між контрольним і дослідним варіантами достовірна при \*\*P=0,01, \*\*\*P= 0,001.

Приживлюваність бруньок склала 100 %. Інтенсивність процесів формування основного пагону і листків з верхівкових бруньок, що пройшли термотерапію, суттєво не відрізнялася від контрольних. Однак, виявлено значне збільшення кількості додаткових пагонів у експлантів, які сформувалися в умовах високої температури (рис. 2).

У сорту Синєва з бруньок, експлантованих після термотерапії, формувалося 6-7 додаткових пагонів і 3-4 пагони в контролі. У мікророслин сорту Степова частота множинного пагоноутворення після термообробки знижувалася на 10 %, але регенерувало 3-4 додаткових пагони, тоді як в контролі розвивалося 1-2 додаткових пагони. Збільшення кількості додаткових пагонів у рослин-регенерантів після термотерапії сприяє збільшенню коефіцієнта розмноження у порівнянні з контролем.

Одержані мікропагони субкультивували на середовище МС18 для укорінення, а потім мікророслини переводили в звичайні умови культивування згідно з розробленою технологією клонального мікророзмноження [13]. Процеси ризогенезу та адаптації до умов *in vivo* у мікророслин після термотерапії не відрізнялися від контрольних.



Рис. 2 Множинне пагоноутворення у рослин лаванди після термотерапії *in vitro*

Детекцію антигенів INSV у рослинах-регенерантах після терапії проводили методом непрямого ІФА. В результаті аналізу встановлено, що звільнення рослин лаванди від вірусу INSV залежало від генотипу та концентрації вірусного антигену у вихідних рослинах.

Ефективність термотерапії для звільнення рослин сорту Синєва від INSV становила 70 %, а при застосуванні методу культури апікальних меристем розміром 0,7 мм одержано 60 % безвірусних рослин. У сорту Степова вільними від вірусу INSV були всі рослини-регенеранти. На нашу думку, це можна пояснити тим, що у вихідної рослини сорту Степова концентрація антигену була нижчою, ніж у сорту Синєва, тому швидкість накопичення вірусних антигенів була меншою; рослини сорту Степова характеризуються більшою інтенсивністю росту як інтактних рослин, так і рослин в культурі *in vitro* та при їх термотерапії порівняно з сортом Синєва, що можливо сприяє збільшенню ділянки апексу пагону, вільної від вірусу.

Оскільки вихід безвірусних рослин після проведення різних прийомів терапії у сорту Синєва коливався в незначних межах (10 %), а у сорту Степова було одержано 100 % здорових рослин, доцільно оцінити ефективність біотехнологічних прийомів з врахуванням їх дії на регенераційну здатність експлантів (табл. 3). Комплексним показником регенераційних процесів у мікророслин є коефіцієнт

розмноження, який враховує дію фактору на частоту регенерації, біометричні показники і показує потенційну кількість рослин, яку можна одержати після мікроживцювання оздоровлених рослин, що пройшли терапію. Аналіз розрахунків, приведених в Табл. 3, показує, що на вихід здорових рослин після мікроживцювання впливає генотип рослини та здатність до регенерації в культурі *in vitro* і під дією температури  $37\pm 1$  °С.

**Таблиця 3**  
**Ефективність біотехнологічних прийомів оздоровлення рослин лаванди з врахуванням коефіцієнту розмноження**

Біотехнологічний прийом	Коефіцієнт розмноження	Кількість рослин після мікроживцювання при N=10		
		всього, шт.	безвірусних, %	безвірусних, шт.
<b>Сорт Синєва</b>				
Культура апікальних меристем розміром 0,7 мм	1 : 13,28	132,8	60,0	79,7
Термотерапія <i>in vitro</i>	1 : 12,25	122,5	70,0	85,8
<b>Сорт Степова</b>				
Культура апікальних меристем розміром 0,7 мм	1 : 9,38	93,8	100,0	93,8
Термотерапія <i>in vitro</i>	1 : 9,70	97,0	100,0	97,0

Примітка. N=10 – умовна кількість рослин після терапії.

Таким чином, для звільнення рослин лаванди від INSV більш ефективним є метод термотерапії *in vitro*, оскільки даний метод забезпечує високий вихід здорових рослин за рахунок високого коефіцієнту розмноження, а також має ряд переваг у порівнянні з повітряною термотерапією *in vivo*: скорочення термінів вирощування рослин перед термотерапією з 1 року до 2-2,5 місяців; зменшення площ культивацийних споруд для вирощування рослин для термообробки; зменшення площі термокамери, необхідної для проведення термотерапії, і, відповідно, затрат електроенергії; виключення етапу стерилізації рослинного матеріалу перед ізолюванням відрослих верхівок пагонів і введенням їх в культуру *in vitro*; скорочення строків одержання оздоровлених рослин з 1-2 років до 4-5 місяців.

#### ВИСНОВКИ

1. Установлено, що оптимальним режимом термотерапії *in vitro* є температура  $37\pm 1$ °С, експозиція обробки – 10 діб, фотоперіод – 16 годин, кращим рослинним матеріалом є укоріненні мікророслини другого пасажу, які при застосованому режимі зберігають життєздатність на рівні 100,0 %.
2. При застосуванні встановленого режиму термотерапії вихід здорових рослин становить 70,0 % у сорту Синєва і 100,0 % у сорту Степова.



Список літератури

1. Эфиромасличное производство / Бугаенко Л.А., Назаренко Л.Г., Савчук Л.П. и др. // Научное обоснование основных направлений развития агропромышленного комплекса Крыма в условиях рыночного производства. – Симферополь: Таврия, 2004. – С. 64-79.
2. Чумак В.А. Вирусные болезни лаванды и пути оздоровления посадочного материала / В.А. Чумак, Н.М. Подмарькова, Н.А. Сенчугова // Сб. трудов ИЭЛР. – Т. XXIII. – Симферополь. – 1992. – С. 48-54.
3. Борьба с вирусными болезнями растений: Пер. с нем./ Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Эртель К. и др. – М.: Агропромиздат, 1986. – 480 с.
4. Журавлев Ю.Н. Фитовирусы в целом растении и в модельных системах / Ю.Н. Журавлев. – М.: Наука, 1979. – 246 с.
5. Малиновский Г.И. Реакция сверхчувствительности растений к вирусам / Г.И. Малиновский // Успехи современной биологии. – 1992. – Т. 112, вып. 4. – С. 528–540.
6. Митрофанова О.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур / О.В. Митрофанова, А.П. Михайлов, А.В. Чехов // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов Никитского ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
7. Лукичева Л.А. Оздоровление вишни и сливы методом термотерапии *in vitro* / Л.А. Лукичева, В.И. Митрофанов // Бюллетень Никит. ботан. сада. – 2002. – Вып. 86. – С. 59-61.
8. Антитела. – Кн. 2. Методы / Под ред. Д. Кэйти. – М., 1991. – С. 152-165.
9. Chauhan Y.S. Thermostabilities of Cell Membrane and Photosynthesis in Cabbage Cultivars Differing in Heat Tolerance / Y.S.Chauhan, T. Senboku // J. Plant Physiol. – 1996. – V. 149. – P. 727-734.
10. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, М.Н. Макрушин и др. / Под ред. Н.Н. Третьякова. – М.: Колос, 2000. – 640 с.
11. Virus taxonomy. Sixth reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Eds. by F.A. Murphy et al. – Springer-Verlag, Wien, 1995. – 587 p.
12. Ruter J.M. Gitaitis Impatiens Necrotic Spot Virus On Woody Ornamentals in Georgia / J.M. Ruter, D. Ron // SNA Research Conference. – 1993. – Vol. 38. – P. 212.
13. Манушкіна Т.М. Біотехнологія клонального мікророзмноження лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) / Т.М. Манушкіна, Л.О. Бугаєнко // Бюллетень Никитського ботанічного саду. – 2009. – Вип. 99. – С. 115-118.

**Манушкіна Т.Н. Термотерапія *in vitro* рослин *Lavandula angustifolia* Mill. / Т.Н. Манушкіна, Л.А. Бугаєнко // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24 (63), № 2. – С.186-194**

Подобрано режим і проведено вивчення ефективності термотерапії *in vitro* для звільнення рослин лаванди від вірусу некротическої пятнистості бальзаміна (INSV).

**Ключевые слова:** лаванда, віруси, термотерапія *in vitro*.

**Manushkina T.N. Thermotherapy *in vitro* of plants *Lavandula angustifolia* Mill./ T.N. Manushkina, Bugaenko L.A. // Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry. – 2011. – Vol. 24 (63), No. 2. – P. 186-194.**

The comparative study of efficiency of technique of improvement thermotherapy *in vitro* for clearing plants of lavender of the Impatiens necrotic spot virus (INSV) is conducted.

**Keywords:** lavender, viruses, thermotherapy *in vitro*.

Поступила в редакцію 11.05.2011 г.