

УДК 581.1

Л. Т. Мищенко¹, Т. Кюне², И. А. Мищенко¹, А. Л. Бойко¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка

²Федеральный центр розведения та досліджень культурних рослин, Інститут захисту рослин і діагностики фітопатогенів, м. Ашерслебен, Німеччина

Инфекционный процесс вируса полосатой мозаики в клиностастированных растениях пшеницы Апогей

Тривале кліностастивання рослин пшениці сорту Апогей загальмовує репродукцію вірусу смугастої мозаїки пшениці. У вертикально кліностастиованих рослин інфекція зникає раніше, ніж у рослин з горизонтальним кліностастиванням.

ВВЕДЕНИЕ

Биологические системы жизнеобеспечения, основой которых являются растения, могут использоваться самостоятельно или в комплексе с физическими или химическими системами, чтобы обеспечить питание, регенерацию воздуха и очищение воды для членов экипажа во время длительных космических миссий. Для такой схемы огромное значение имеет высокая активность фотосинтетического аппарата, непосредственно связанная с продуктивностью растений и обеспечивается, в первую очередь, выращиванием здоровых растений.

Исследования по космической биологии проведены преимущественно на здоровых растениях [7, 13, 14, 16, 17]. В то же время стрессовые условия космоса могут стать причиной появления различных болезней в растениях, особенно вирусных, которые на Земле могут оставаться в латентной форме. Практически не изученным остается состояние вирусинфицированных растений в условиях космического полета. Пшеница нами выбрана в качестве объекта исследования, так как она может стать полезной диетой, богатой на белок и витамины для космонавтов во время длительных полетов. Из-за широкого распространения фитовирусов изучалось влияние моделированной микрогравитации, т. е. трансформированной среды, на физиологические и продукционные процессы здоровых и вирусинфицированных растений пшеницы различного

географического происхождения. В результате были выявлены сорта с высоким адаптационным потенциалом [5, 15]. Инфекционный процесс фитовирусов в трансформированной среде ранее не изучался, за исключением отдельных работ [1, 6].

Целью настоящей работы было исследовать динамику инфекционного процесса вируса полосатой мозаики пшеницы (ВПМП) в растениях яровой пшеницы сорта Апогей при разных условиях клиностастирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на универсальном клиностае «Цикл-2», который реализует несколько схем переориентации растений относительно вектора силы земного тяготения (рис. 1). Объектом исследования была суперкарликовая пшеница сорта Апогей. Контрольные (неподвижные) и опытные растения выращивали в специальном помещении с контролируемым микроклиматом и освещением 10000 лк в режиме «день/ночь» 16/8 ч при температуре 21 ± 1 °С. В фазе двух листьев половину растений в клиностае и неподвижном контроле искусственно инфицировали ВПМП. Вирус уникален своей высокой специфичностью, потому безопасен для других растений, экипажа, самих летательных аппаратов и может быть использован для космических исследований. Растения выращивали в

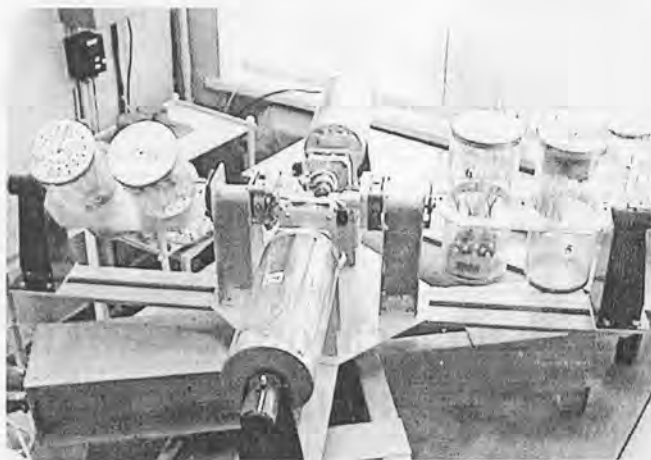


Рис. 1. Растения пшеницы Апогей в клиностате «Цикл-2»



Рис. 2. Электронограмма очищенного препарата ВСМП. Инструментальное увеличение 40000

специальных контейнерах из оргстекла по 35 штук в каждом. Клиностамирование было в горизонтальном и вертикальном режиме при 2 об/мин; в вертикальном было два варианта: $R = 1.0$ и $R = 1.6$, где R — расстояние от центра вращения клиностата до центра вращения контейнеров (условный радиус); скорость вращения платформы — 1 об/мин. Для изучения морфологии вирусов использовали трансмиссионные электронные микроскопы JEM-1200 (JEOL, Япония), ЭМ-125 (Сумы, Украина) с негативным контрастированием вирусных частиц, и ультратонкие срезы тканей инфицированных листьев. Выделение и очистку ВПМП проводили по методике [8] в нашей модификации.

Суть метода заключалась в следующем. Листья с симптомами поражения ВПМП промывали дистиллированной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге, взвешивали и измельчали на мясорубке. Гомогенат заливали двумя объемами (мл/г) 10 мМ K_2HPO_4 , доводя pH до 6.1 с помощью 1.0 М уксусной кислоты и выдерживали сутки при температуре $+4^\circ C$. Отжимали сок и центрифугировали его 30 мин при скорости 5000 об/мин. Надосадочную жидкость доводили до pH = 7.5...8.0 с помощью 1.0 М NaOH и смешивали с 10 мМ лимоннокислым натрием 1:1 и потом прибавляли 1 % тритон X-100 на мешалке (30 мин). Экстракт центрифугировали 1.8 ч со скоростью 27000 об/мин при $5^\circ C$ в роторе № 30 центрифуги УЦП 2-85. Надосадочную жидкость сливали, а осадок ресуспендировали и смывали 10 мМ лимоннокислым натрием (pH 8.0). Вирусосодержащий материал после отмывания ставили на ночь на магнитную мешалку. Потом этот материал

осветляли 5 мин (5000 об/мин на центрифуге K-23).

Наслаивали вирусосодержащий материал на 4 мл 20 % сахарозной подушки на 10 мМ лимоннокислом натрии (pH 8.0) и центрифугировали (25000 об/мин, 3 ч, $+5^\circ C$) на ультрацентрифуге L5-50B («Beckman», США). Осадок ресуспендировали 10 мМ лимоннокислым натрием (pH = 8.0) и ставили на ночь на магнитную мешалку. Осветляли 5 мин на K-23 при скорости 5000 об/мин. Вирусосодержащий материал (2-4 мл) наслаивали на линейный градиент сахарозы 10—40 % (V/V), который готовили на 10 мМ лимоннокислом натрии и центрифугировали 3 ч при 27000 об/мин в роторе SW-40 «Beckman». Осадок ресуспендировали 10 мМ лимоннокислым натрием (pH 8.0) и ставили на ночь на магнитную мешалку. Диализировали против 0.1 М лимоннокислого натрия (pH 6.5). Чистоту очищенного препарата ВПМП проверяли спектрофотометрически на «Specord M40 UVVIS» («Carl Zeiss Jena», Германия), по соотношению E260/E280, которое составляло 1.32, что характерно для потивирусов [8].

Вирус полосатой мозаики пшеницы является типичным представителем рода *Tritimovirus* семейства *Potyviridae* (потивирусов), для которого характерны нитевидные вирионы с модалной длиной около 700 нм (рис. 2). Для получения поликлональной иммунной сыворотки к ВПМП мы использовали серию внутривенных инъекций каждые 2-3 дня такими дозами очищенного вируса: 60—60—90—90—120 (мкг). Внутримышечная инъекция вводилась через три месяца с 200 мкг вируса, смешанно-

смешанного с таким же объемом адьюванта Фрейнда. Сыворотку получали по стандартной методике [4].

Вирусологические методы диагностики ВПМП, которые являются традиционными (электронная микроскопия, иммунофлуоресценция, иммунодиффузия в агаре и т. д.) имеют свои недостатки: неколичественное определение, относительно низкая чувствительность и специфичность, трудоемкость серийных определений. Иммуноферментный анализ (ИФА) исключает эти недостатки, не зависит от морфологии вирионов и обеспечивает высокую точность и специфичность. Он превышает другие методы по чувствительности и специфичности. Этот метод использовали при изучении тонкой структуры различных таксономических групп фитовирусов [9—12], для установления антигенного и филогенетического родства [3, 18]. Именно поэтому для определения динамики инфекционного процесса ВПМП был использован твердофазный иммуноферментный анализ в непрямом варианте РГА (plate trapped antigen) — ELISA.

Суть метода заключалась в следующем. Для иммобилизации антигена на плашках мы использовали 0.05 М карбонатный буфер (рН 9.6). Экстракты растений в карбонатном буфере просветляли на протяжении 20 мин низкоскоростным центрифугированием («Centrifuge 5415 D», Eppendorf) при скорости 5000 об/мин. В лунки полистироловых микроплат фирмы «Sarsted» (США) или «Nunc poly sorp» (Дания) вносили по 100 мкл соответствующего разведения сока и инкубировали на протяжении 16—18 ч при +4 °С для сорбции антигена. Неадсорбированный материал удаляли, микроплаты промывали три раза 0.1 М фосфатно-солевым буфером с добавлением 0.2 % твина-20 рН 7.4 (ФСБТ). На следующем этапе в лунки вносили по 100 мкл 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА) («Sigma», США) и инкубировали в течение 60 мин при 37 °С, микроплаты снова отмывали и вносили по 100 мкл антисыворотки к ВПМП (1/5000). После внесения антисыворотки планшеты инкубировали 120 мин при 37 °С или 16—18 ч при +4 °С, сыворотку удаляли и промывали три раза ФСБТ. Потом вносили по 100 мкл меченого пероксидазой антивидового конъюгата (антитела козы против глобулинов кроля фирмы «Sigma») в рабочем разведении 1/20000, инкубировали 60 мин при 37 °С, промывали четыре раза ФСБТ и вносили по 100 мкл субстратной смеси на основе ортофенилдиамина (ОФД) фирмы «Fluka», Швейцария. Оптическую плотность продукта ферментативной реакции оценивали через 30 мин инкубации при комнатной температуре на ридере фирмы «Termo Labsystems

Opsys MR» (США) с программным обеспечением Dynex Revelation Quicklink, при двух длинах волн 492 / 620 нм. Останавливали пероксидазную реакцию внесением раствора 2 М серной кислоты. При определении ВПМП в очищенных препаратах в качестве контроля служил очищенный препарат ВТМ, а при анализе растительного материала, зараженного ВПМП, в качестве контроля использовали сок безвирусных растений в одних и тех же разведениях, что и анализируемый материал. Для контроля специфичности антисыворотки к ВПМП ставили реакцию с соком здоровых растений и гетерологичным антигеном — вирусом табачной мозаики. Анализировали образцы в 3-4 повторностях. Реакцию считали положительной, если оптическая плотность продукта ферментативной реакции исследовательских образцов превышала больше чем в два раза показатели отрицательного контроля. Статистическую обработку проводили методом дисперсионного анализа по Доспехову [2] с использованием соответствующих программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении агроэкологического мониторинга пораженности посевов озимой пшеницы вирусными инфекциями в Украине наиболее распространенным и вредоносным оказался вирус полосатой мозаики пшеницы (ВПМП), представленный на рис. 2. Вирус является очень удобным для модельных лабораторных исследований, так как может передаваться механически как и в природных условиях — клещом *Aceria tulipae* или *Aceria tritici* Schev. (в Украине).

Исследования динамики инфекционного процесса в растениях пшеницы Апогей (весенняя вегетация) показало, что на 8-9-е сутки после инфицирования методом ELISA выявлен вирус при горизонтальном и вертикальном $R = 1.0$ клиностаировании (рис. 3, а и б), а на 10-11-е сутки — в варианте $R = 1.6$ в титре 1/2560 (рис. 3, в). Начиная с 8-х по 18-е сутки в варианте с горизонтальным вращением контейнеров ВПМП репродуцируется в высоком титре 1/2560, позднее титр вируса снижается: на 23-и сутки до 1/80, а на 25-е сутки методом ELISA вирус не регистрируется (рис. 3, а). При вертикальном клиностаировании $R = 1.0$ репродукция ВПМП выявляется на 8-9-е сутки, титр составляет 1/320 (рис. 3, б), потом увеличивается с 11-х по 14-е сутки и составляет 1/2560.

На 16-е сутки титр вируса снижался до 1/640, а начиная с 18-х суток и к концу эксперимента (40 сут) вирус не обнаруживался вовсе.

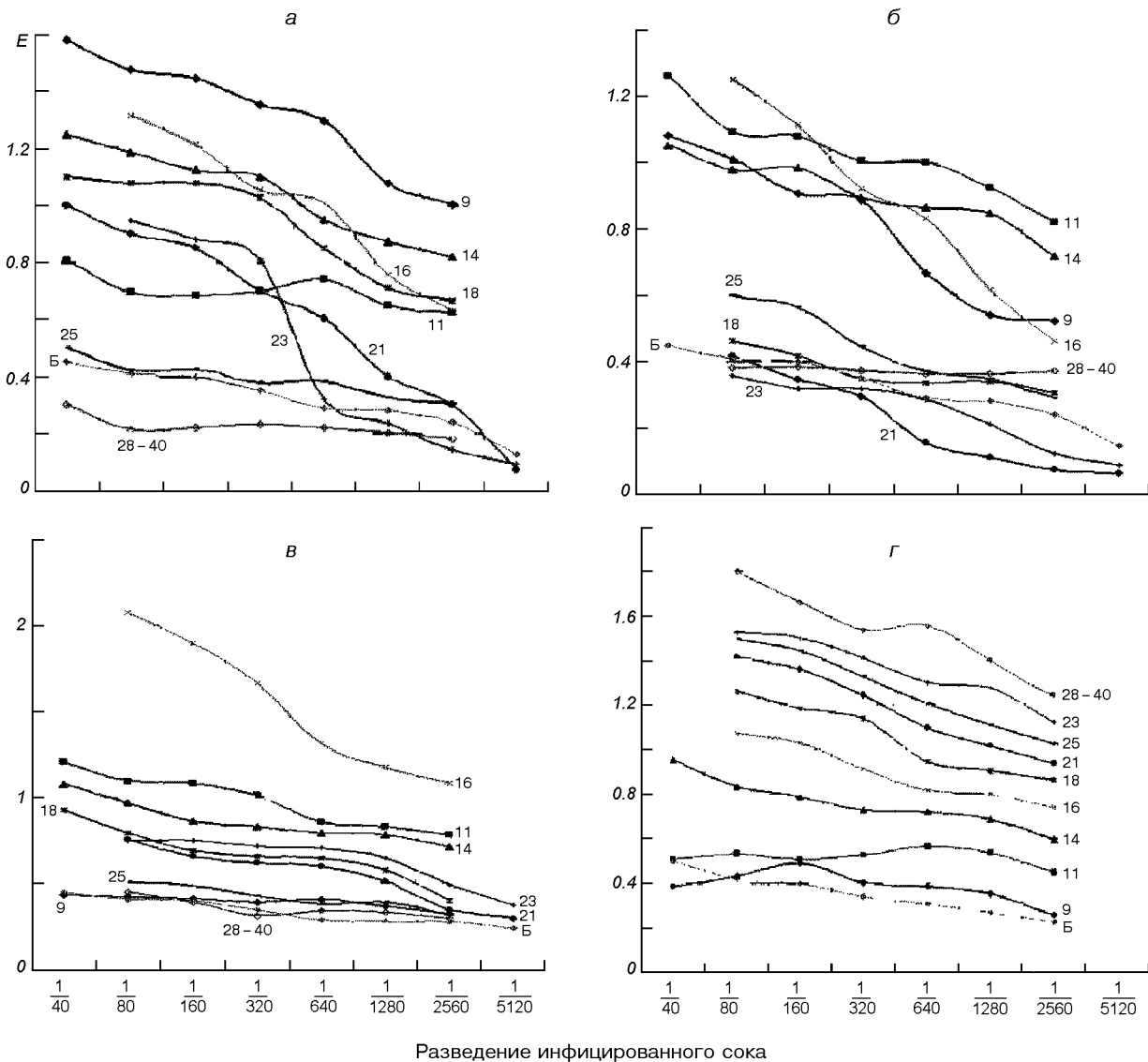


Рис. 3. Динамика репродукции ВПМП: *а* — при горизонтальном клиностатировании; *б* — при вертикальном ($R = 1.0$) клиностатировании; *в* — при вертикальном ($R = 1.6$) клиностатировании; *г* — в наземном неподвижном контроле. Показана зависимость оптической плотности E для $\lambda = 492$ нм от разведения инфицированного сока для разных длительностей эксперимента (цифры у кривых, сут). Кривая Б — безвирусные растения

С опозданием на 1-2 сут развивалась инфекция у растений, клиностатированных при $R = 1.6$ (рис. 3, в). В инокулированных растениях вирус регистрировался в титре $1/2560$ начиная с 11-х по 16-е сутки, к 23-м суткам титр вируса снижался до $1/1280$, а начиная с 25-х суток до конца эксперимента ВСМП в растениях пшеницы не выявлялся.

Иначе проходил инфекционный процесс ВПМП в неподвижных вариантах. По данным ELISA в не-

подвижных вариантах репродукция вируса выявлялась на 2 сут позже, чем при горизонтальном и вертикальном $R = 1.0$ вращении, и на 1 сут позже, чем при вертикальном $R = 1.6$ клиностатировании. Но начиная с 14-х суток и до конца эксперимента (40 сут) отмечалась репродукция ВПМП в высоком титре: $1/2560$ (рис. 3, г). Более позднее появления вируса в неподвижных вариантах можно объяснить повышенной стойкостью пшеницы к ВПМП из-за

отсутствия стрессора — клиностатирования.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что длительное клиностатирование яровой пшеницы Апогей угнетает репродукцию вируса полосатой мозаики пшеницы.

1. Диденко Л. Ф., Пархоменко Н. И., Максименко Л. А. и др. Влияние клиностатирования на вирус курчавой карликовости картофеля *in vitro* и *in vivo* // *Космічна наука і технологія*.—1999.—5, № 5/6.—С. 118—122.
2. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). — М., 1985.—351 с.
3. Какарека Н. Н. Сравнительная антигенная характеристика капсидных белков потивирусов (дальневосточные изоляты) и их иммунодиагностика: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Владивосток, 1995.—20 с.
4. Кэйти Д. Антитела. Методы. — М.: Мир, 1991.—281 с.
5. Мищенко Л. Т. Влияние моделированной микрогравитации на ростовые процессы и фотосинтетический аппарат растений *Triticum aestivum* L., инфицированных вирусом полосатой мозаики пшеницы // *Космічна наука і технологія*.—2002.—8, № 5/6.—С. 66—70.
6. Мищенко Л. Т., Бойко А. Л., Чернюк С. О. Вплив кліно-статування на показники серологічного аналізу вірусу смугастої мозаїки пшениці в рослинах *Triticum aestivum* // *Біополімери і клітина*.—1999.—15, № 4.—С. 319—323.
7. Bingham G. E., Jones S. B., Or D., et al. Microgravity effects on water supply and substrate properties in porous matrix root support systems // *Acta Astronaut.*—2000.—47, N 11.—P. 839—848.
8. Brakke M. R. Degradation of Wheat Streak Mosaic Virus Capsid Protein During Leaf Senescence // *Phytopathology*.—1990.—80, N 12.—P. 1401—1405.
9. Fomitcheva V. W., Ehrig F., Richter K., Kühne T. Serological analysis of the two RNA2-encoded proteins of barley mild mosaic virus // *J. Plant Diseases and Protection*.—1999.—106, N 3.—P. 265—274.
10. Koenig R. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses // *J. Gen. Virol.*—1978.—40, N 2.—P. 309—318.
11. Koenig R. Indirect ELYSA methods for the broad specificity detection of plant viruses // *G. Virol.*—1981.—55, N 1.—P. 53—62.
12. Koenig R., Paul H. Z. Variants of ELISA in plant viruses diagnosis // *J. Virol. Meth.*—1982.—5, N 2.—P. 113—125.
13. Kordyum E. L. Biology of plant cell in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.*—1997.—171.—P. 1—78.
14. Kordyum E. L. Gravisensitivity of Plant Cells: Status and Prospects // *Proc. «Life in Space for Life on Earth» 23rd Annual Int. Gravitational Physiology Meeting.* — Stockholm, Sweden, 2002.—P. 305—306.
15. Mishchenko, L. T., Silayeva A. M. Effect of Clinostating on Physiological and Biochemical Characteristics of Wheat Plants Infected by the Streak Mosaic Virus of Wheat (SMVW) // *Horticulture and Vegetable Growing (Lithuania)*.—1998.—17, N 3.—P. 386—394.
16. Monje O., Bingham G. E., Carman J. G., et al. Canopy photosynthesis and transpiration in microgravity, gas exchange measurements aboard Mir // *Adv. Space Res.*—2000.—26, N 2.—P. 303—306.
17. Musgrave M., Kuang A., Brown C., Matthews S. Changes in Arabidopsis leaf ultrastructure, chlorophyll and carbohydrate content during space flight depend on ventilation // *Ann. Bot.*—1998.—81.—P. 503—512.
18. Rabenstein F., Seifers D. L., Schubert J., et al. Phylogenetic relationships, strain diversity and biogeography of tritimoviruses // *J. Gen. Virol.*—2002.—83.—P. 895—906.

INFECTION PROCESS OF WHEAT STREAK MOSAIC VIRUS IN CLINOSTATED APOGEE WHEAT PLANTS

L. T. Mishchenko, T. Kühne, I. A. Mishchenko, A. L. Boyko

A long-term clinostating of Apogee wheat plants impedes the wheat Streak mosaic virus reproduction. The infection disappears sooner in vertically clinostated plants than in horizontally clinostated ones.