

УДК [578.864+633.11]:632.938:57.043]

Л. Т. Міщенко, Л. І. Остапченко, О. М. Філенко

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вплив клиностатування на стійкість пшениці до вірусної інфекції

Надійшла до редакції 04.11.04

Досліджували вплив клиностатування (вертикальне та горизонтальне) при швидкості обертання контейнерів 2 об/хв, а платформи — 1 об/хв на вірусостійкість рослин пшениці сорту Апогей. Вперше за умов модельованої мікрогравітації (клиностатування) одержано врожай зерна пшениці сорту Апогей: як неінфікованих так і інфікованих вірусом смугастої мозаїки пшениці рослин. Вперше з'ясовано характер перебігу вірусної інфекції при тривалому клиностатуванні та встановлено наявність вірусу у рослинах пшениці на 18-ту добу після інюкації методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Найменш сприятливим варіантом досліду для репродукції вірусу виявилось вертикальне клиностатування. Збільшення вмісту загального азоту в колосках у цьому варіанті дає підставу зробити припущення про можливий синтез інтерфероноподібних білків у рослинах, подібно до того, як це відбувається у тварин.

ВСТУП

Пшениця є однією із основних культур в системах життєзабезпечення космонавтів, оскільки вона важливий білковий та вітамінний компонент їжі, регенерант кисню. Тому надзвичайно актуальним при тривалих міжпланетних місіях є здійснення онтогенезу здорових рослин пшениці протягом кількох поколінь.

В кінці ХХ століття було встановлено, що рослини можуть рости і розвиватися в умовах космічного польоту [10, 11, 13], зокрема пшениця проходить всі фази онтогенезу і дає врожай [3]. Але не виключено, що при створенні автотрофної ланки у біологічній системі життєзабезпечення космонавтів стресові умови мікрогравітації можуть спричинити появу різних хвороб у рослин, особливо вірусних, котрі в наземних умовах залишалися в латентній формі. Оскільки дослідження взаємовідносин фіто-вірусів з рослинами-хазяями на Землі в умовах модельованої мікрогравітації раніше не проводилися, то їхня актуальність не викликає ніяких сумнівів.

Метою даної роботи було з'ясувати вплив клиностатування на вірусостійкість пшениці суперкарликового сорту Апогей.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експерименти проводили на універсальному клино-статі, який реалізує декілька схем переорієнтації рослин відносно вектора прискорення сили земного тяжіння [4]. Об'єктом дослідження був вірус смугастої мозаїки пшениці (ВСМП), рід *Tritimovirus* і суперкарликова пшениця сорту Апогей (селекція США) [4]. Контрольні (нерухомі) і дослідні рослини вирощували за контрольованих умов (освітленість 15 тис. лк в режимі «день/ніч» 16/8 год при температурі 21 ± 1 °С вдень та 17 ± 1 °С вночі). Штучним субстратом (базальтове волокно) заповнювали картонні пакети розміром $7 \times 7 \times 7$ см і розміщували на дні контейнерів. В цей субстрат, зволожений дистильованою водою, висаджували по 35 штук 1-добових наклюнутих проростків пшениці. У процесі вегетації рослини поливали спеціальним поживним розчином, що містить комплекс макро- і мікроелементів. Вологість субстрату становила 70—75 %. У фазі двох листків половину рослин у клиностаті і нерухомому контролі штучно інфікували ВСМП [4]. Для вірусологічних досліджень відбирали рослини протягом усього вегетаційного періоду. Для отримання урожаю зерен було залишено саму мінімальну кількість — лише по три

рослини в кожному контейнері. Репродукцію вірусу визначали методом твердофазного імуоферментного аналізу (das ELISA) [5, 12]. Загальний вміст азоту в колосках у фазу колосіння визначали за методикою К'ельдаля (напівмікрометод) [1].

Для виявлення вірусу смугастої мозаїки при штучній інокуляції рослин пшениці Апогей, вирощуваних за умов трансформованого середовища, було використано метод ревертної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR).

Для виділення та очистки PolyA mRNA був застосований Sigma's Messenger RNA micro isolation kit. Виділену mRNA використовували для одержання cDNA з використанням RT-PCR-kit (Sigma) та ініціюючого праймеру — M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3') [9].

Одержану cDNA використовували для постановки PCR. Для цього були використані специфічні олігонуклеотидні праймери, що розглядаються в літературі як універсальні для членів родини *Potyvirus* (потівірусів) [9], а саме:

M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'),

Sprimer (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3'),

X = A, G, C чи T; Y = T чи C; Z = A чи G RT-PCR

проводили, використовуючи реактиви «Sigma» (США) в термоциклері (ампліфікатор ДНК багатоканальний «Терцик», АО ДНК-технологія, Москва, 2001 р.) в режимі: 94 °C — 2 хв — перший цикл; 94 °C — 30 с, 47 °C — 1 хв, 72 °C — 2 хв — 30 циклів; 72 °C — 10 хв — заключний цикл. В PCR реакції брали 5 мкл cDNA, по 200 мкМ кожного dNTP, 20 рМоль кожного праймера, 1U Tag DNA polymerase в 50 мкл загального об'єму.

Продукт PCR досліджували шляхом електрофорезу в 1.5 % агарозному гелі в камері для горизонтального форезу. Як маркер використовували ДНК (Sigma): 10, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0; 94 °C 0.5 kb. Візуалізували гелі з допомогою High Performans Ultraviolet Transilluminator UWP, фотографували за допомогою digital camera Olympus C-3040 200M.

Статистичну оцінку вірогідності отриманих результатів проводили методом дисперсійного аналізу з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel та AGROSTAT.

РЕЗУЛЬТАТИ

Незаперечним підтвердженням наявності інфекції в рослинах пшениці сорту Апогей за умов клиностакування було виявлення ВСМП методом RT-PCR.

Результати, представлені на рис. 1, показують, що як в нерухомому контролі (трек 1), так і при горизонтальному (трек 2) та вертикальному клиностакуваннях (трек 3) після ампліфікації виявлено фрагмент ДНК довжиною близько 1500 нуклеотидів, що свідчить про наявність вірусу в рослинах пшениці на 18-ту добу після інокуляції, тобто в період його максимальної репродукції за даними ELISA. У здоровому нерухомому варіанті такого фрагменту немає (рис. 1, трек 4).

Оскільки нуклеотидна послідовність жодного з генів полтавського ізоляту ВСМП невідома, для полімеразної реакції нами використані праймери, що звичайно розглядаються як універсальні для членів родини *Potyvirus*. Два з них, Sprimer (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3', X = A, G, C чи T; Y = T чи C; Z = A чи G) та M4T ((5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), специфічні до консервативної послідовності GNNSGQP в області Nib цистрону.

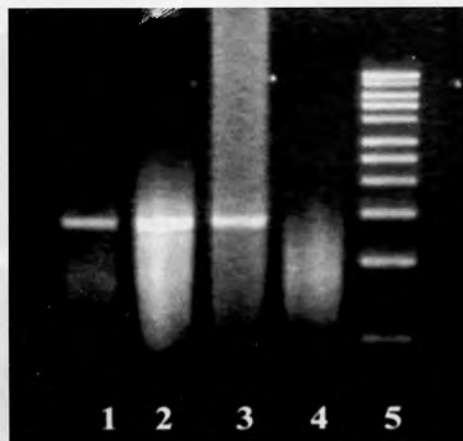
Використання праймерів M4T (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC (T)₁₅-3'), та Sprimer (5'-GGX AAY AAY AGY GGX CAZ CC-3'), дало змогу чітко виявити наявність продукту ампліфікації. З літературних даних відомо, що застосування цих праймерів при певних умовах ампліфікації призводить до синтезу ампліфікаційного продукту розмірами близько 1500 нуклеотидів [9]. Такий же продукт виявлений і в нашому досліді.

На рис. 2, а представлено очищений препарат ВСМП в нерухомому контролі. Віріони являють собою слабо зігнуті нитки, характерні для потівірусів. На 18-ту добу після інокуляції ВСМП клиностакуваних рослин пшениці віріони набули форму дещо зігнутої підкови (рис. 2, б).

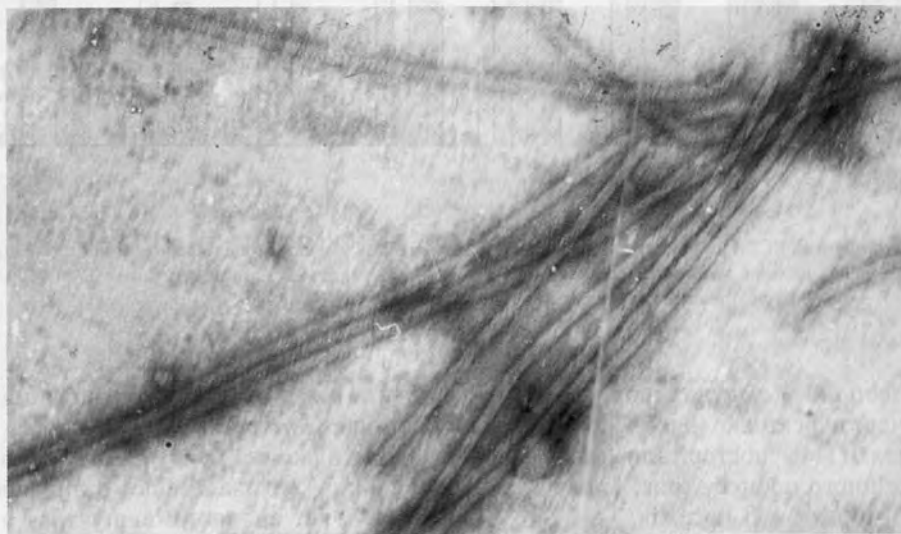
Дослідження динаміки інфекційного процесу в рослинах пшениці сорту Апогей (весняна вегетація) показало, що при горизонтальному клиностакуванні вірус виявляється методом das-ELISA на дев'яту добу після інфікування (рис. 3), його титр становить 1/2560. Починаючи з 18-ї доби титр вірусу зменшується, а від 21-ї доби і до кінця спостереження (28—40 діб) вірус не виявляється. При вертикальному клиностакуванні вірус виявляється на дві доби пізніше, тобто на 11-ту добу. З 23-ї доби титр вірусу зменшується, а з 25-ї доби і до кінця спостереження вірус не виявляється (рис. 3).

Нами також були проведені дослідження вірулентності фітовірусу за умов клиностакування. В модельних дослідах показано, що класичний вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), виділений із вірусифікованих рослин томатів сорту Баян, вирощених в умовах клиностакування, заражав рослини-індика-

Рис. 1. Дослідження продукту ампліфікації cDNA ВСМП з використанням праймерів M4T та Sprimer в 1.5 % агарозному гелі 1 — рослини пшениці, інфіковані ВСМП у нерухомому контролі, 2 — рослини пшениці, інфіковані ВСМП при горизонтальному клиностатуванні, 3 — рослини пшениці, інфіковані ВСМП при вертикальному клиностатуванні ($R = 1.6$), 4 — здорові рослини пшениці сорту Апогей у нерухомому контролі, 5 — маркер ДНК 10, 8.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 (kb)



а



б



Рис. 2. Електроннограма вірусу смугастої мозаїки пшениці, виділеного із рослин пшениці сорту Апогей: а — вирощених за умов нерухомого контролю, б — на 16-ту добу після інюкуляції за умов клиностатування. Інструментальне збільшення $40000\times$

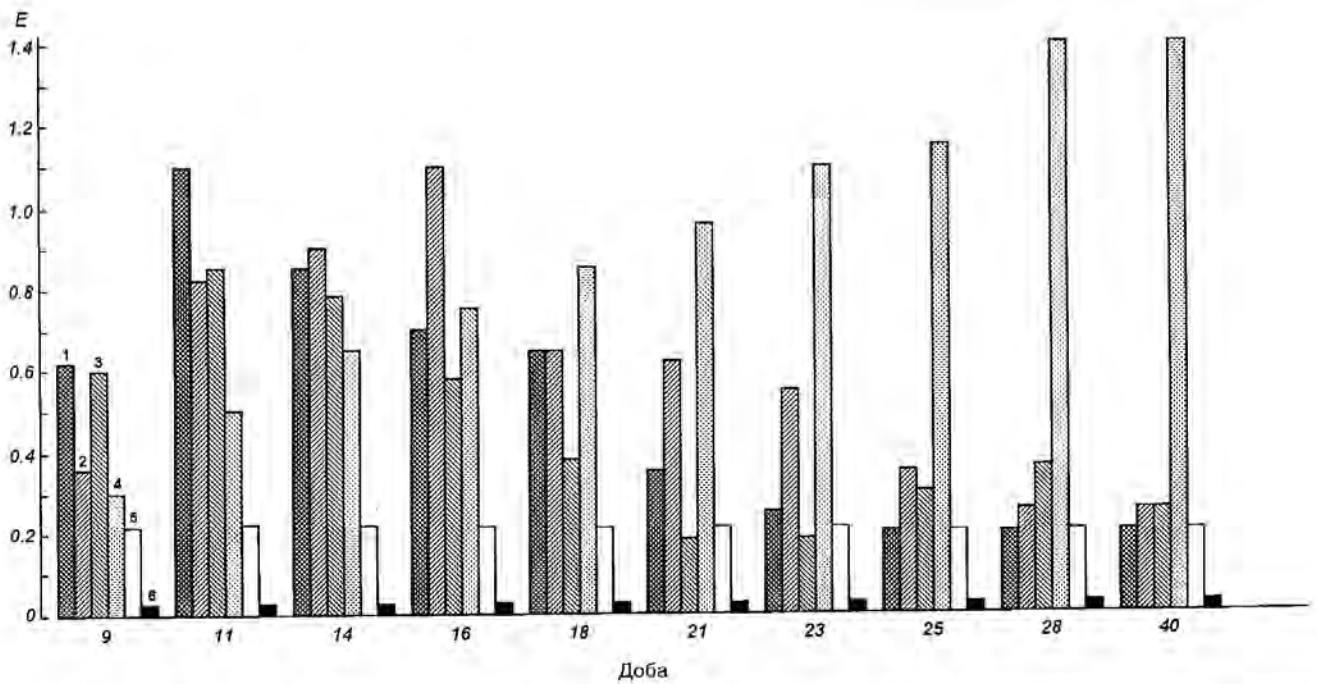


Рис. 3. Зниження репродукції ВСМП у рослин пшениці сорту Апогей в умовах модельованої мікрогравітації: 1 — горизонтальне клиностатування, 2 — вертикальне клиностатування $R = 1.6$, 3 — вертикальне клиностатування $R = 1.0$, 4 — неclinостатовані рослини (контроль), 5 — безвірусні рослини (негативний контроль), 6 — $NIP_{0.05}$.

тори тютюну *Nicotiana Tabacum* сорту Samsun з системною вірусною інфекцією (рис. 4, а). Симптоми, характерні для ВТМ, спостерігалися на тютюні в динаміці інфекційного процесу (рис. 4, б) в період осінньої вегетації протягом 3 пасажів.

Є підстава вважати, що інгібування репродукції вірусу може відбитися на продуктивності рослин. Нами вперше отримано урожай пшениці сорту Апогей в умовах модельованої мікрогравітації (82 доби клиностатування). Оскільки до одержання урожаю було залишено лише по три рослини в кожному контейнері, то ми приводимо тільки його якісні зміни.

Кількість зерен у вірусінфікованих рослин при клиностатуванні значно перевищувала нерухомий контроль, хоча маса одного зерна була нижчою, ніж у нерухомому контролі. За умов клиностатування (як горизонтального так і вертикального) зростає кількість зерен відносно нерухомого контролю при зменшенні їхньої маси.

На рис. 5 показано зерна, одержані із рослин, вирощених за умов клиностатування. Різниця у зовнішньому вигляді зерен помітна навіть візуально.

Отже, клиностатування пригнічує процеси репродукції вірусу, що показано на узагальненій діаграмі (рис. 3) динаміки інфекційного процесу ВСМП. Фактично ми спостерігали деяке оздоров-

лення рослин ВСМП-інфікованої пшениці за умов клиностатування.

Дослідження вмісту загального азоту в колосках пшениці показало, що у вірусінфікованих рослин його вміст значно зменшується у нерухомому контролі, порівняно зі здоровими (таблиця).

Клиностатування здорових рослин (горизонтальне і вертикальне, $R = 1.6$) призводить до несуттєвих змін у вмісті загального азоту в колосках. Але горизонтальне клиностатування вірусінфікованих рослин знижує вміст загального азоту порівняно з нерухомими здоровими та підвищує його

Вплив клиностатування на вміст загального азоту в колосках пшениці сорту Апогей

№	Варіанти	Тип клиностатування	Загальний азот в колосках (% на абс. суху р-ну)
1	Здорові	Нерухомий контейнер	4.74±0.02
2	Інфіковані	Нерухомий контейнер	3.31±0.02
3	Здорові	Горизонтальне	4.68±0.01
4	Інфіковані	Горизонтальне	3.95±0.01
5	Здорові	Вертикальне $R = 1.0$	4.04±0.01
6	Інфіковані	Вертикальне $R = 1.0$	4.95±0.02
7	Здорові	Вертикальне $R = 1.6$	4.88±0.03
8	Інфіковані	Вертикальне $R = 1.6$	3.94±0.02

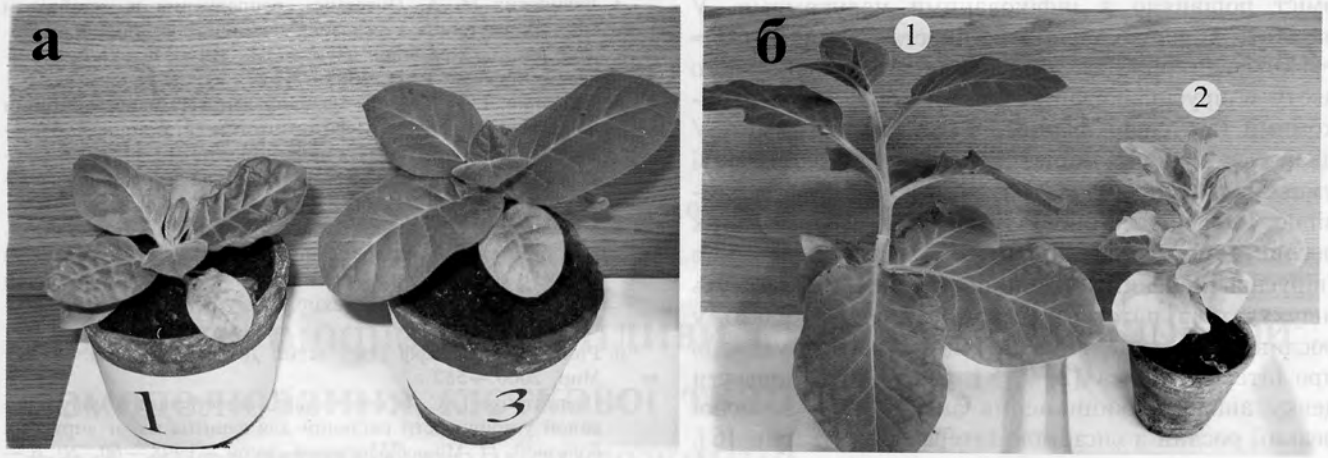


Рис. 4. Передача вірусу тютюнової мозаїки із клиноставаних рослин томатів на рослини-індикатори тютюну: *а* — на 18-ту добу після інокуляції (1 — інфіковані, 3 — здорові), *б* — на 56-ту добу після інокуляції (1 — здорові, без інфікування, 2 — інфіковані ВТМ)

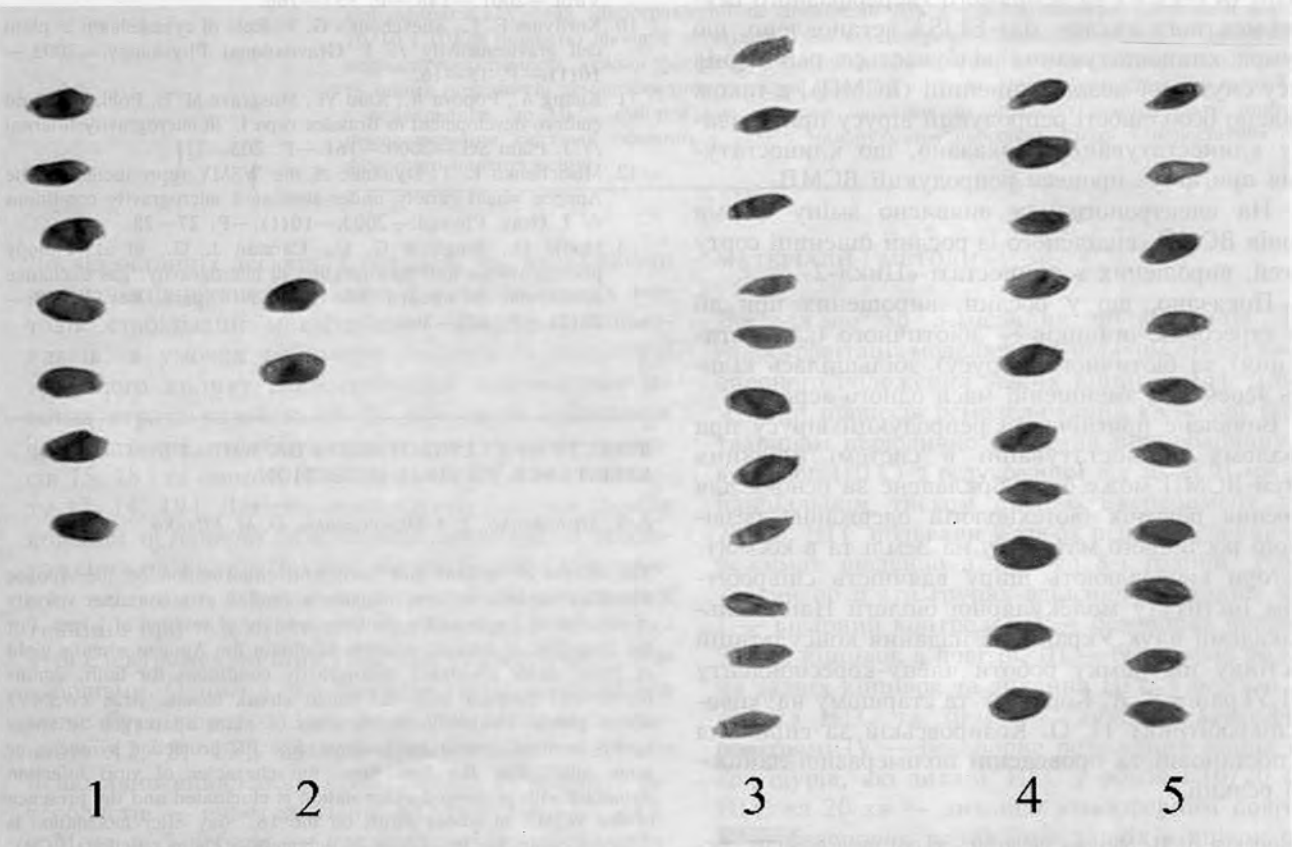


Рис. 5. Вплив умов клиностагування на урожайність зерна пшениці сорту Апогей: 1 — здорові (не інфіковані), нерухомий контроль; 2 — ВСМП-інфіковані, нерухомий контроль; 3 — ВСМП-інфіковані, горизонтальне клиностагування; 4 — ВСМП-інфіковані, вертикальне клиностагування, $R = 1.0$; 5 — ВСМП-інфіковані, вертикальне клиностагування, $R = 1.6$

вміст порівняно з інфікованими нерухомими. У варіанті з вертикальним клиностакуванням ($R = 1.0$) спостерігалось збільшення вмісту загального азоту у вірусінфікованих рослин порівняно з нерухомими (вірусінфікованими і навіть здоровими). У цьому ж варіанті виявлено найменш сприятливі умови для репродукції вірусу. Отже, цілком імовірно, що при клиностакуванні вірусінфікованих рослин, тобто при дії двох стресових чинників (вірусної інфекції та клиностакування), можуть індукуватися патоген-залежні білки (PR-білки) у рослинах пшениці, які з позицій сучасних уявлень про інтерферогенез [2, 7, 8], дозволяють провести деяку аналогію виникнення антивірусної захисної реакції рослин з системою інтерферону тварин [6].

ВИСНОВКИ

1. Методами ревертної полімеразної ланцюгової реакції (RT-PCR) та непрямого твердофазного імуноферментного аналізу *das-ELISA* встановлено, що за умов клиностакування відбувається реплікація вірусу смугастої мозаїки пшениці (ВСМП), а також виявлено особливості репродукції вірусу при тривалому клиностакуванні. Показано, що клиностакування пригнічує процеси репродукції ВСМП.

2. На електронограмах виявлено зміну форми віріонів ВСМП, виділеного із рослин пшениці сорту Апогей, вирощених в клиностаті «Цикл-2».

3. Показано, що у рослин, вирощених при дії двох стресових чинників — абіотичного (клиностакування) та біотичного (вірусу) збільшилась кількість зерен при зменшенні маси одного зерна.

4. Виявлене пригнічення репродукції вірусу при тривалому клиностакуванні в системі пшениця Апогей-ВСМП може бути покладене за основу для створення новітніх біотехнологій одержання безвірусного рослинного матеріалу на Землі та в космосі.

Автори висловлюють щирі вдячність співробітникам Інституту молекулярної біології Національної академії наук України за надання консультацій і постійну підтримку роботи члену-кореспонденту НАН України В. А. Кордюму та старшому науковому співробітнику Н. О. Козировській за сприяння при постановці та проведенні полімеразної ланцюгової реакції.

1. Ермаков А. И. Методы биохимического исследования растений. — Л.: Колос, 1972.—456 с.
2. Ладыгина М. Е., Бабоша А. В. Физиолого-биохимическая природа вирусного патогенеза устойчивости и регуляции антиинфекционной активности // Физиология растений.—1996.—43, № 5.—С. 729—742.

3. Левинских М. А. Онтогенез, репродукция и метаболизм высших растений в условиях космического полета: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М.: Ин-т Медико-биологических проблем РАН, 2002.—49 с.
4. Мищенко Л. Т. Влияние моделированной микрогравитации на ростовые процессы и фотосинтетический аппарат растительной *Triticum aestivum L.*, инфицированных вирусом полосатой мозаики пшеницы // Космична наука і технологія.—2002.—8, № 5/6.—С. 66—70.
5. Мищенко Л. Т., Кюне Т., Мищенко И. А., Бойко А. Л. Инфекционный процесс вируса полосатой мозаики (ВПМП) в клиностакированных растениях пшеницы Апогей // Космична наука і технологія.—2003.—9, № 5/6.—С. 211—215.
6. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. — М.: Мир, 2000.—582 с.
7. Щербатенко І. С. Использование естественной и индуцированной устойчивости растений для защиты их от вирусных болезней // Мікробіологічний журн.—1998.—60, № 6.—С. 56—65.
8. Щербатенко І. С. Стійкість рослин до вірусів // Мікробіологічний журн.—1996.—58, № 2.—С. 81—101.
9. Chen J., Adams M. J. A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family // Arch. Virol.—2001.—146.—P. 757—766.
10. Kordyum E. L., Shevchenko G. V. Role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity // J. Gravitational Physiology.—2003.—10(1).—P. 15—16.
11. Kuang A., Popova A., Xiao Yi., Musgrave M. E. Pollination and embryo development in *Brassica rapa L.* in microgravity Internat // J. Plant Sci.—2000.—161.—P. 203—211.
12. Mishchenko L. T. Dynamic of the WSMV reproduction in the Apogee wheat variety under simulated microgravity conditions // J. Grav. Physiol.—2003.—10(1).—P. 27—28.
13. 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(2).—P. 303—306.

EFFECTS OF CLINOROTATION ON WHEAT'S RESISTANCE TO VIRAL INFECTION

L. T. Mishchenko, L. I. Ostapchenko, O. M. Filenko

The effects of vertical and horizontal clinorotation on the Apogee wheat's resistance to viral infection a studied at a container velocity of rotation of 2 rpm and a platform velocity of rotation of 1 rpm. For the first time, it became possible to obtain the Apogee wheat's yield of grain under simulated microgravity conditions for both, noninfected and infected with the wheat streak mosaic virus (WSMV) wheat plants. Evidently, the process of plant adaptation to stress agents involves certain mechanisms, like PR-protection synthesis or some other. For the first time, the character of viral infection dynamics with prolonged clinorotation is elucidated and the presence of the WSMV in wheat plants on the 18th day after inoculation is detected using the procedure of polymerase chain reaction (PCR). Vertical clinorotation proved the least suitable experimental variant for viral reproduction. Increase in total nitrogen content in spikes, which occurred in this variant, gives grounds to suggest a possibility of interferon-like protein synthesis in plants similar to that of interferon system in animals.