

Вплив кліноостатування на показники серологічного аналізу вірусу смугастої мозаїки пшениці в рослинах *Triticum aestivum*

Л. Т. Міщенко, А. Л. Бойко, С. О. Чернюк

Київський Національний університет ім. Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 250017, Україна

*Досліджували вплив мікрогравітації на показник титру вірусу смугастої мозаїки пшениці (ВСМП) в рослинах *T. aestivum*, які вирощували в умовах горизонтального та вертикального кліноостатування, а також в нормальних, земних умовах. Показано, що горизонтальне та вертикальне кліноостатування викликає зміни титру ВСМП.*

Вступ. Різне підвищення зацікавленості людства у використанні космічного простору призвело до появи цілого ряду допоміжних дослідів, проблемою яких є розробка нових підходів до вивчення космічних факторів у земних умовах. Особливий інтерес серед останніх з точки зору біології викликає стан невагомості, який може спричинити непередбачувані наслідки.

При перебуванні рослин у невагомості відмічається порушення цілого ряду фізіологічних функцій: це зміна в диханні, орієнтації органів проростків, перерозподіл органел клітин [1, 2].

У бактерій під впливом невагомості відбувається неоднозначний ріст та розвиток [3, 4]. Для більшості організмів характерні певні порушення генетичного апарату [5], які досить різноманітні і реєструються на рівні як структурних змін хромосом, так і генних мутацій [6]. Це в свою чергу призводить до зменшення або підвищення чутливості живих організмів до дії іонізуючого випромінювання та хімічних мутагенних факторів [7]. У деяких випадках спостерігається зміна клітинного циклу. Наприклад, у клітинах кінчиків корінців проростків пшениці відмічено пригнічення ранньої профазы [4]. У насінин *Crepis capillaris*, пророщених в умовах невагомості, спостерігається

поява значної кількості багатоядерних та багатоядерцевих клітин. У дослідному матеріалі відмічалася поява клітин з 4 та 5 ядрами, не зареєстрованих у контролі. Все це свідчить про порушення механізму мітозу в клітинах кореневої системи проростків *Crepis capillaris*, яке, ймовірно, викликається невагомістю [8]. Взагалі першим на невагомість реагує метаболізм організмів [9].

У зв'язку зі складністю проведення біологічних експериментів безпосередньо у невагомості в наш час використовують альтернативні підходи [1, 10, 11]. Методами, які дозволяють судити про гравітаційні впливи на організм, є використання кліноостатів і так званих «перевернутих варіантів», які дозволяють змінювати напрямок прикладення гравітаційної сили до об'єкту.

Використання кліноостатування для дослідження репродукції фітовірусів є новим як для вірусології, так і космобіології. Інтерес, пов'язаний з цією тематикою, пояснюється тим, що під час довгого перебування на орбіті людина в перспективі має вирощувати здорові рослини для забезпечення свого харчового раціону. Продуктивність же такого вирощування у великій мірі буде залежати від чистоти рослинного матеріалу. Тим більше, що в умовах невагомості можлива зміна патогенності збудника та взагалі його біологічних властивостей. Цілком вірогідно, що деякі віруси під довготривалим впливом невагомості можуть стати вірулент-

нішими. Отже, подібні дослідження мають як теоретичне, так і практичне значення. Як показали дослідження [12, 13], вірус смугастої мозаїки пшениці (потівірус, ВСМП) є одним з найпоширеніших вірусних захворювань пшениці в Україні. Частка загального ураження цим збудником складає від 25 до 75 % в залежності від року. Тому саме цей вірус було використано в нашій роботі як модель. З точки зору фундаментальної науки будь-які дані, що стосуються репродукції вірусів в умовах кліно-статування, мають, безперечно, велике значення для розуміння не тільки механізмів впливу невагомості на живі організми, а й загальних принципів репродукції вірусів у рослинній клітині та їхнього транспорту в рослині.

Матеріали і методи. У роботі використано рослини пшениці *Triticum aestivum* сорту Альбатрос Одеський. Дослід складався з трьох варіантів. Для першого брали рослини, вирощені в умовах обертання повздовжньої осі росту рослини у вертикальній площині, паралельній вектору прискорення

сили тяжіння (рис. 1, а), його можна назвати вертикальним, оскільки рослина обертається в вертикальній площині навколо осі, перпендикулярній осі її росту. За таких умов відбувалася постійна зміна кута між вектором сили земного тяжіння та віссю росту рослини. Для другого варіанту — рослини, вирощені в умовах горизонтального кліно-статування (рис. 1, б), оскільки в цьому випадку повздовжня вісь росту рослини розташована горизонтально і рослина обертається навколо неї. Третій варіант — рослини, вирощені в контейнерах у нормальних земних умовах. У досліді використовувалося по 50 рослин з кожного варіанту. Рослини усіх варіантів вирощувалися при освітленні 10 Вт/м². Субстратом слугували нітроцелюлозні трубочки, які попередньо були автоклавовані та продезинфіковані бактерицидною лампою протягом 2 год. Як поживне середовище використовували суміш Кнопа, якою зволожували нітроцелюлозні трубочки з розрахунку 10 мл розчину на один контейнер.

Перед висівом зерна пшениці обробляли 1 %-м розчином перманганату калію протягом 20 хв для знищення патогенної флори. Субстрат поливали один раз на добу. Частину рослин інфікували ВСМП у фазі двох листків [13]. Після цього їх витримували в тому ж режимі протягом 30 діб.

Заражені вірусом рослини досліджували за загальновідомими методиками, зокрема, за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) (сендвіч-метод) та методу подвійної імунодифузії в агарі по Ухтерлоні з попередньою підготовкою антигена [13]. Для проведення серологічних аналізів використовували гіперімунну кролячу сироватку до ВСМП та антикролячу сироватку, мічену пероксидазою хрину. Розведення специфічної антисироватки до ВСМП становило 1/10, кон'югату — 1/100. Як хромоген використовували АБТС (2,2'-азиноди-[3-етил-2,3-дигідробензотіазолін-6-сульфонової кислоти]). Дані подвійної імунодифузії в агарі оцінювали візуально, а результати ІФА реєстрували на автоматичному ELISA-ридері («Sumal», Німеччина) при довжині хвилі 405 нм, після чого будували калібрувальні графіки [15].

Результати і обговорення. Наші попередні дослідження показали, що кліностатування вірусінфікованих рослин пшениці неадекватно впливає на ростові процеси та фотосинтетичний апарат. Очевидно, різні умови кліностатування по-різному впливають на репродукцію ВСМП у клітинах.

Після проведення першого досліду в період з лютого по березень 1997 року було отримано рослини, інфіковані ВСМП, які пройшли горизонтальне та вертикальне кліностатування протягом 30 діб

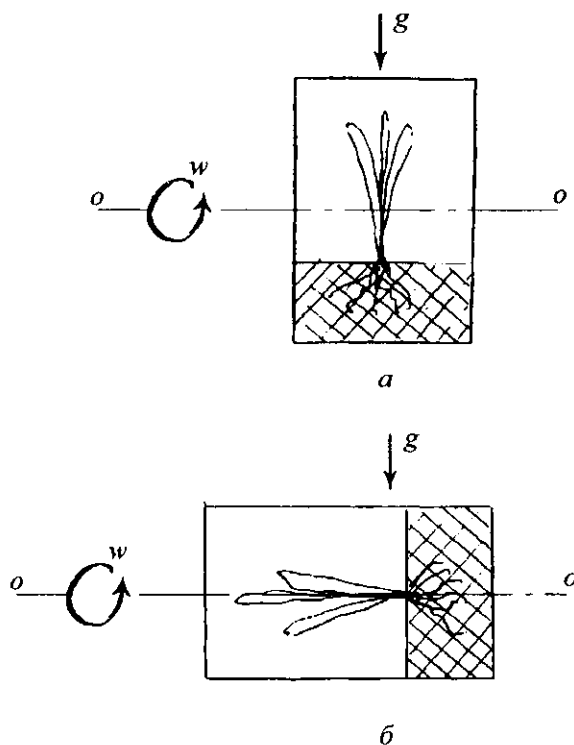


Рис. 1. Схеми кліностатування: а — вертикальне; б — горизонтальне. Позначення: oo — вісь обертання контейнера; g — прискорення земного тяжіння, м/с²; w — швидкість обертання контейнера, рад/с

з частотою обертання 2 оберти на хвилину, містили вірус смугастої мозаїки, титр якого був меншим за такий в аналогічних рослинах, які не пройшли кліностатування. Аналіз інфекційного соку методом подвійної імунодифузії в агарі та ІФА це підтвердив. Лінії преципітації спостерігалися між комірками з інфекційним соком та специфічною антисироваткою до ВСМП. Найбільше розведення інфекційного соку рослин, вирощених у нормальних умовах, яке давало позитивний результат з антисироваткою до ВСМП, становило 1/2. Що стосується інфекційного соку рослин, які пройшли вертикальне та горизонтальне кліностатування, то лінії преципітації спостерігалися між лунками з нерозведеним соком та антисироваткою до ВСМП. Це в свою чергу свідчить про те, що концентрація ВСМП у рослинах, які пройшли кліностатування, зменшувалася порівняно з рослинами, вирощеними в нормальних умовах.

Для отримання точніших даних нами було використано ІФА (сендвіч-варіант), внаслідок чого отримано криві титрування (рис. 2, а).

З кривих 1 та 2 видно, що титр вірусу в рослинах після проведення горизонтального кліностатування зменшився. Якщо в рослинах, вирощених у нормальних умовах, титр вірусу становив 1/160, то в рослинах, які пройшли горизонтальне кліностатування, він склав 1/80.

Аналогічна картина спостерігалася при вертикальному обертанні рослин. При аналізі кривих 1 та 3 (рис. 2), які отримали після застосування ІФА, було зареєстровано зменшення титру ВСМП у рослинах, які пройшли це обертання, в порівнянні з рослинами, які вирощувалися в звичайних умовах, а також з рослинами, кліностатованими в горизонтальному режимі. Титр вірусу в цих рослинах становив 1/40.

Результати другого експерименту, поставленого в період з березня по квітень 1997 р., та третього, проведеного в період з квітня по травень, показали, що титр вірусу в рослинах, які пройшли горизонтальне кліностатування та вертикальне обертання рослин, також зменшувався порівняно з рослинами, які вирощувалися в нормальних умовах. Це підтвердили дані реакції подвійної імунодифузії в агарі.

Результати проведення серологічного аналізу рослин пшениці другого дослідження показали, що концентрація вірусу в рослинах, які вирощувалися в умовах кліностатування, була меншою, ніж в рослинах, вирощених у нормальних умовах. При цьому лінії преципітації спостерігалися лише між комірками з інфекційним соком рослин, які не пройшли кліностатування, та лункою зі специфічною

антисироваткою до ВСМП. Інфекційний сік кліностатованих рослин не давав позитивної реакції на наявність вірусу.

Стабільніші дані було отримано після застосування ІФА (рис. 2, б). Видно, що при вертикальному та горизонтальному кліностатуванні титр вірусу зменшувався. Якщо в рослинах, вирощених за нормальних умов, титр вірусу становив 1/160, то в рослинах, які пройшли кліностатування, він склав 1/40.

Аналогічні результати було отримано після аналізу дослідних рослин третього експерименту. Найбільше розведення інфекційного соку рослин, вирощених в нормальних умовах, при якому спостерігалася утворення ліній преципітації в агарі, становило 1/2. У цих рослинах концентрація вірусу була найвищою. Стосовно інфекційного соку рослин, кліностатованих у горизонтальному режимі, то лінії преципітації спостерігалися лише між лунками з нерозведеним соком та лункою з антисироваткою. Між лунками з інфекційним соком рослин, які пройшли вертикальне обертання, та лункою зі специфічною антисироваткою ліній преципітації взагалі не відмічено.

Аналіз цих рослин за допомогою ІФА показав, що титр вірусу в рослинах, вирощених у нормальних умовах, становив 1/320, у рослинах, які пройшли горизонтальне кліностатування, — 1/80, а в рослинах, вирощених в умовах вертикального обертання — 1/20 (рис. 2, в).

Проведені дослідження показали, що при 30-добовому вирощуванні рослин пшениці в кліностаті (із них лише 15 діб після штучного інокулювання ВСМП) спостерігалася зменшення титру ВСМП при кліностатуванні.

Порівнюючи результати різних серій дослідів, зазначимо, що у квітні—травні репродукція та накопичення вірусу йдуть значно інтенсивніше, ніж у березні (титр ВСМП у два рази вищий).

Можна припустити, що зміни титру ВСМП при кліностатуванні залежать від фізіологічного стану рослин пшениці.

Визначення вмісту хлорофілів показало, що в листках, інфікованих ВСМП, їх було менше при вертикальному кліностатуванні, відмічено значно нижчу фотохімічну активність хлоропластів порівняно зі здоровими, як це показано нами раніше [16]. Можна вважати, що в листках пшениці, заражених ВСМП при кліностатуванні, порушується функціонування світлової фази фотосинтезу, зменшується вміст пігментів, що призводить до зниження кількості фотосинтетичних асимілятів (таблиця).

Аналізуючи результати даної таблиці, можна

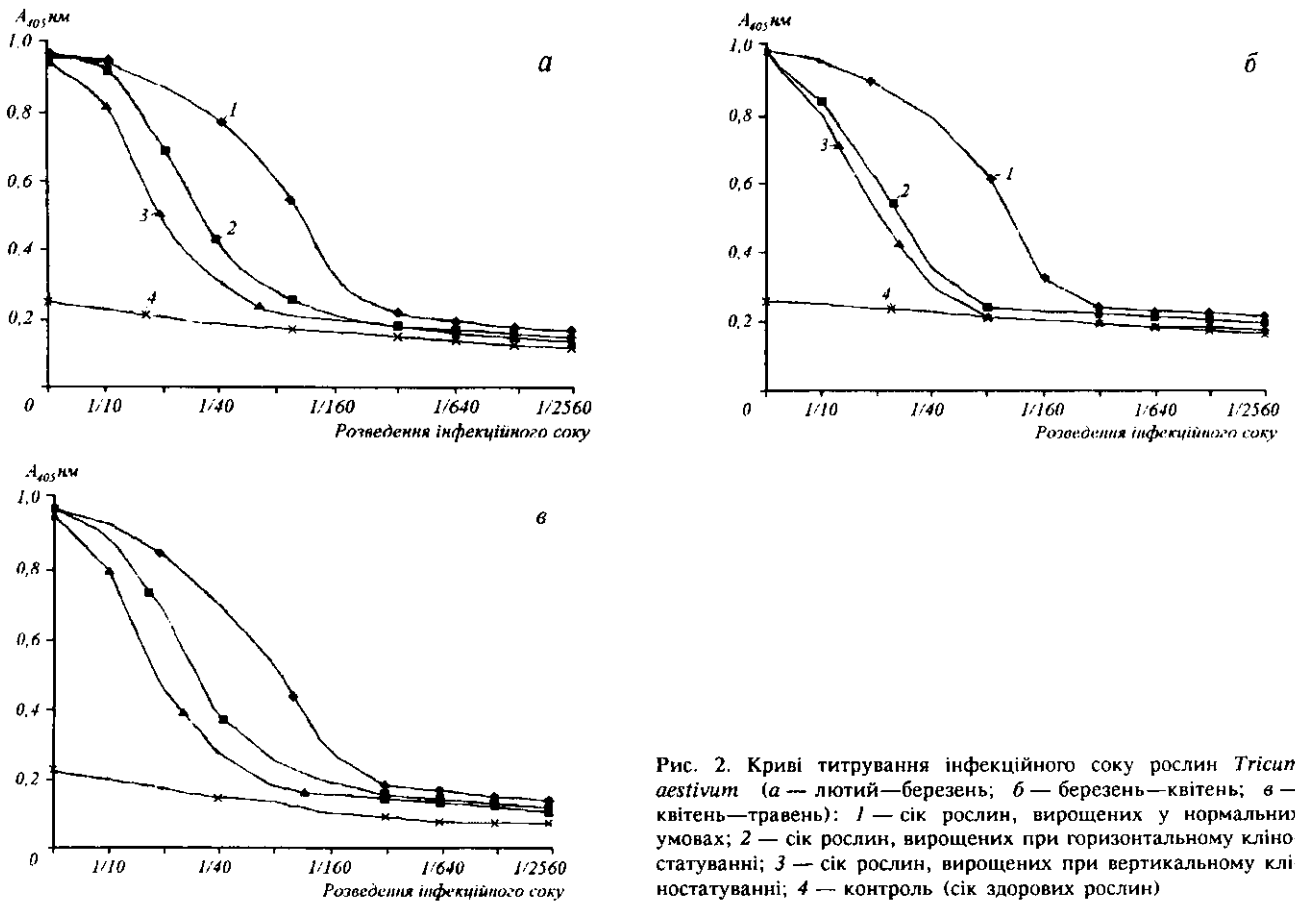


Рис. 2. Криві титрування інфекційного соку рослин *Triticum aestivum* (а — лютий—березень; б — березень—квітень; в — квітень—травень): 1 — сік рослин, вирощених у нормальних умовах; 2 — сік рослин, вирощених при горизонтальному кліно-статуванні; 3 — сік рослин, вирощених при вертикальному кліно-статуванні; 4 — контроль (сік здорових рослин)

зробити висновок, що при кліностатуванні зменшується вміст вуглеводів як у листі, так і в коренях, причому в значно більшій мірі у вірусінфікованих рослинах.

Так, у листках здорових рослин пшениці, що вирощувалися в нормальних умовах, сума цукрів становить 0,26, тобто 100 % (контроль). У здорових рослин при горизонтальному кліностатуванні цей показник складає 73 % (до контролю), а при вертикальному — 65 %. У вірусінфікованих рослин при горизонтальному і вертикальному кліностатуванні сума цукрів 46 та 38 % (до контролю) відповідно. Аналогічна закономірність щодо вмісту цукрів спостерігається і в кореневій системі.

Таким чином, зниження активності фотосинтетичного апарату та інших фізіологічних процесів при кліностатуванні призводить до зменшення репродукції та накопичення вірусу, яке й проявляється в зміні титру ВСМП.

Ці дослідження доцільно в подальшому здійснювати в умовах космічного польоту, що дозволить з'ясувати взаємодію між вірусом і рослинною клітиною в трансформованому середовищі.

Автори висловлюють подяку співробітникам кафедри автоматизації Національного аграрного університету за допомогу при конструюванні та експлуатації кліностату «Цикл-2».

Дослідження фінансуються Національним Космічним Агентством України та Київським університетом імені Тараса Шевченка.

Л. Т. Мищенко, А. Л. Бойко, С. О. Чернюк

Влияние клиностатирования на показатели серологического анализа вируса полосатой мозаики пшеницы в растениях *Triticum aestivum*

Резюме

Исследовали влияние микрогравитации на показатель титра вируса полосатой мозаики пшеницы (ВСМП) в растениях *T.*

Вплив кліностакування на вміст цукрів в рослинах *T. aestivum*

Варіант	Листя (% на суху речовину)			Корені (% на суху речовину)		
	Відновлюючі цукри	Сума цукрів	Сахароза	Відновлюючі цукри	Сума цукрів	Сахароза
Здорові рослини в нормальних умовах	0,05	0,26	0,19	0,59	1,05	0,44
Здорові, горизонтальне кліностакування	0,07	0,19	0,12	0,60	0,98	0,36
ВСМП, горизонтальне кліностакування	0,07	0,12	0,05	0,54	0,89	0,33
Здорові, вертикальне кліностакування	0,10	0,17	0,07	0,51	0,88	0,35
ВСМП, вертикальне кліностакування	0,06	0,10	0,04	0,33	0,66	0,31

Примітка. Різниця між варіантами (середні величини із чотирьох повторностей) достовірна при $p \leq 0,01$; частота обертання контейнерів 2 хв^{-1} .

aestivum, вирощувані в умовах горизонтального і вертикального кліностакування, а також в нормальних, земних умовах. Показано, що кліностакування викликає змінення титра ВПМП.

L. T. Mishchenko, A. L. Boyko, S. O. Chernyuk

The influence of microgravitation on characteristics of viruses of striped mosaic wheat in *Triticum aestivum*

Summary

The influence of microgravitation on the characteristics of viruses of striped mosaic wheat in *Triticum aestivum*, grown under the conditions of horizontal, vertical clinostation as well as under usual conditions was researched. It was studied that horizontal and vertical clinostation provokes the changes in the titres of striped wheat mosaics.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кордюм Е. Л. Современные проблемы космической клеточной фитобиологии // Пробл. косм. биологии.—1994.—73—291 с.
2. Gray S. W., Edwards B. F. The effect of weightlessness on the growth and orientation of roots of monocotyledonous seedlings // The experiments of biosatellite.—Washington, 1971.—P. 123—126.
3. Ваулина Э. Н., Винников Я. А., Дубинин Н. П. Влияние космического полета на развивающиеся организмы.—К.: Наук. думка, 1978.—160 с.
4. Gizenko O. G., Gurjian A. A. On the biological role of gravity. Some results and prospects of space research in satellites and spaceship // Life Sci. and Space Res.—1965.—3—P. 241—246.
5. Dubinin N. P., Vaulina E. N., Kosik V. Effects of space flight factors on the heredity of higher and lower plants // Life Sci. and Space Res.—1973.—11.—P. 101—110.
6. Гарина К. П., Романова Н. И. Влияние факторов космического полета и этиленамина на семена ячменя // Косм. исследования.—1971.—9, № 1.—С. 949—956.

7. Dubinin N. P., Vaulina E. N. Gravity weightlessness and the genetic structures of organisms // Life Sci. and Space Res.—1974.—12.—P. 123—128.
8. Dubinina L. G., Chernikova O. P. Space effects in *Crepis capillaris* seeds // Jap. J. Gen.—1968.—43, N 9.—P. 470—474.
9. Reynolds O. E., Saunders J. F. The scientific conclusions of biosatellite 2 // The experiments of biosatellite.—Washington, 1971.—P. 347—349.
10. Меркус А. И. Сила тяжести в процессах роста растений.—М.: Наука, 1990.—184 с.
11. Mishchenko L. T., Silayeva A. M., Boyko A. L. Effect of simulated microgravity on the virus-infected wheat plants: 31 Sci. Assembly of COSPAR.—Birmingham: Univ. publ., 1996.—P. 385.
12. Бойко А. Л., Мищенко Л. Т., Барышевский А. П., Глуздяев В. Г., Гейко Н. И., Краснюков А. Т., Бублик П. И. Рекомендации по диагностике вирусных болезней озимой пшеницы и мерам борьбы с ними в условиях УССР.—Киев: Урожай, 1990.—25 с.
13. Решетник Г. В., Мищенко Л. Т., Колесник Л. В., Бойко А. Л. Выявления вируса смугасти мозаїки пшениці в деяких областях України // Мікробіол. журн.—1996.—58, № 2.—С. 39—45.
14. Гнутова Р. В. Серология и иммунохимия вирусов растений.—М.: Наука, 1993.—300 с.
15. Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. Теория и практика иммуноферментного анализа.—М.: Высш. шк., 1991.—288 с.
16. 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) // Sodininkystė ir daržininkystė. Lithuanian Baktai—1998 (Horticulture Veg table Crowing).—1998.—17, N 3.—P. 386—394.

Надійшла до редакції 30.04.98