

УДК 57.086.3:581.817:578.863.

ЕЛЕКТРОННОМІКРОСКОПІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ АПІКАЛЬНИХ МЕРИСТЕМ КАРТОПЛІ ТА ВПЛИВ ХІМІОТЕРАПІЇ НА ПРОЦЕС ОЗДОРОВЛЕННЯ**Зарицький М.М., Петренко О.М.**Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, Україна, 14027

Досліджувались апікальні меристеми різних розмірів ряду сортів картоплі, інфікованих X, M і S-вірусами картоплі (ХВК, МВК, СВК). Визначено рівень проникнення цих вірусів у меристему. Вивчено структуру апікальних меристем картоплі, враженої вірусами, визначено рівень залягання вірусних включень і характер внутрішньоклітинної локалізації M-вірусу. Проведено оздоровлення 2 сортів картоплі методом культури меристеми у поєднанні з антивірусними речовинами, похідними імідазотриазолу.

Ключові слова: електронна мікроскопія, ультратонкі зрізи, віруси картоплі, апікальні меристеми, культура тканин, хіміотерапія.

Більшість районованих сортів картоплі уражені вірусами, які нерівномірно розповсюджуються в рослинах. Так, верхівки пагонів картоплі – меристеми містять безвірусну зону і величина цієї зони варіює залежно від сорту і ступеня ураженості вихідного матеріалу [1]. Цю особливість покладено в основу методу культури апікальної меристеми, який широко застосовується для оздоровлення картоплі. Відомо, що найбільш ефективним способом одержання вільних від вірусів рослин є культивування експлантів розміром не більше 100 мкм [2], але приживлення таких меристем дуже низьке.

Рядом дослідників досягнуто певних успіхів в оздоровленні картоплі шляхом культивування меристем розміром 300-400 мкм. Такі меристеми можуть забезпечити оздоровлення від L, Y, A-вірусів, проте вони не ефективні для оздоровлення від X, M, S-вірусів, які можуть проникати в меристему на різну глибину [3,4].

Найефективнішим способом оздоровлення картоплі є метод із застосуванням культури меристеми в поєднанні з термотерапією і хіміотерапією. Відомо, що вплив антивірусних речовин на звільнення рослин від вірусів у поєднанні з культурою меристеми специфічний. Оздоровлення залежить як від препарату, так і від біологічних властивостей сорту, а також від штамового складу вірусів та комбінації

вірусів у змішаних інфекціях [5,6,7].

Ми ставили за мету за допомогою електронної мікроскопії ультратонких серійних зрізів апікальної меристеми вивчити структуру меристеми картоплі, враженої X, M і S-вірусами, визначити рівень локалізації вірусних включень, встановити залежність локалізації вірусів від розвитку плазмодесм, а також дослідити терапевтичні властивості 2-х нових речовин, похідних імідазотриазолу від M-вірусу.

Матеріали і методи. Досліджували картоплю сортів Приєкульська рання, Пекуровська, Розара, Синьоглазка, Луговська і Альвара, вражених M, S, X-вірусами в моноінфекції. Рослини вирощували у вегетаційній кімнаті. Перед виділенням меристем проводили тестування імунологічними та електронномікроскопічними методами. Для отримання ультратонких зрізів виділяли меристеми розміром 300-400 мкм, як контроль використовували меристеми безвірусних рослин.

Вивчали локалізацію X, M, S-вірусів у стеблових верхівках районованих сортів картоплі (Приєкульська рання, Пекуровська, Розара, Синьоглазка) методом ультратонких зрізів. Меристеми фіксували у 6,5%-ному розчині глютаральдегіда 3 години, 2%-ним OsO₄ 2 години, проводили дегідратацію в серії спиртів, заливали в ЕПОН-812. Одержували ультратонкі зрізи на ультрамікротомі УМТП-2 з вершини меристеми, серії зрізів (125-250) товщиною 0,005 мкм, після забарвлення 1%-ним розчином уранілацетату та розчином цитрату свинцю за Рейнольдсом [8] досліджували в електронному мікроскопі EM-125. При визначенні розмірів зрізаної меристеми, а також рівня залягання вірусних включень, ураховували ступінь стискання тканин меристеми після заливки (в межах 25 %).

Для діагностування вірусів у меристематичних тканинах використовували експрес-метод, який полягав в тому, що на сіточки-бленди з формваровою плівкою-основою наносили краплю стерильної дистильованої води, в яку занурювали зрізаною основою меристему різних розмірів (від 66 до 375 мкм). Через 30-40 сек меристеми знімали, а препарат контрастували 2 %-ним ФВК, рН 7,0-7,2. Препарати досліджували в електронному мікроскопі при інструментальному збільшенні 20-25 тисяч разів.

В дослідах по оздоровленню методом культури меристеми в поєднанні з хіміотерапією як модельну систему використовували M-вірус картоплі, слабо- і сильнопатогенні штами на рослинах картоплі різних сортів (Луговська, Альвара). Провели випробування антифiтовірусної дії двох нових синтетичних речовин: АВР1 і АВР2. Ці речовини є похідними

імідазотриазолу. Експериментальний синтез проводився співробітниками кафедри хімії Чернігівського технологічного університету.

Досліджували 2 концентрації нових речовин – 0,1 і 0,05 г/л, використовуючи двофазну дію: у першу фазу витримували частинки зелених пагонів картоплі в рідкому розчині антивірусних речовин протягом 2 діб; у другу фазу виділяли експланти розміром 300 – 500 мкм і висаджували їх на поживне середовище з додаванням АВР.

Як контроль під час порівняння ефективності антивірусної дії використовували антивірусний комплекс, який складався із 2,4-діоксогексагідро-1,3,5-триазину (ДГТ), ціаногуанідину і розгалуженого манану (РМ) – полісахариду, виділеного із дріжджів роду *Candida sp.* (клітинні дріжджові манани), надані доктором біол. наук Коваленком О.Г.

Проводили комплексне тестування отриманих ліній рослин-регенерантів, використовуючи методи імуноферментного аналізу, електронної мікроскопії і рослин-індикаторів.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою t-тесту програми Microsoft Excel.

Результати та їх обговорення. Електронномікроскопічні дослідження ультратонких зрізів меристемних тканин картоплі дають певне уявлення про розвиток вірусної інфекції в них, а також можливість виявити деякі деталі механізму розвитку інфекції.

При вивченні меристем досліджували такі питання: характер будови та ультраструктурну організацію клітин меристематичної тканини картоплі по зонах; наявність плазмодесм в клітинах на різних рівнях; розподіл і спосіб локалізації вірусних включень у меристематичних клітинах.

Деталі ультраструктурної організації меристемних клітин були встановлені на прикладі сорту Прикульська рання. В результаті проведених досліджень серій ультратонких зрізів встановлено, що меристемні тканини в зоні 10-15 мкм від верхівки складаються з клітин без вакуолей, цитоплазма має рівномірний гомогенний матрикс із слабо диференційованими клітинними органелами. Починаючи з зони 20-30 мкм вже спостерігається диференціація клітинних органодів. З'являються вакуолі, матрикс ядра більш просвітлений. Характерним для цих ділянок тканин є наявність у вакуолях більшості периферійних клітин порівняно великих глобулярних тіл, можливо, саме там накопичуються в клітині рістактивуючі речовини (рис. 1). Ядерця в клітинах, як правило, мали центральні просвітлені зони, які не спостерігалися в ядерцях звичайної листової тканини.

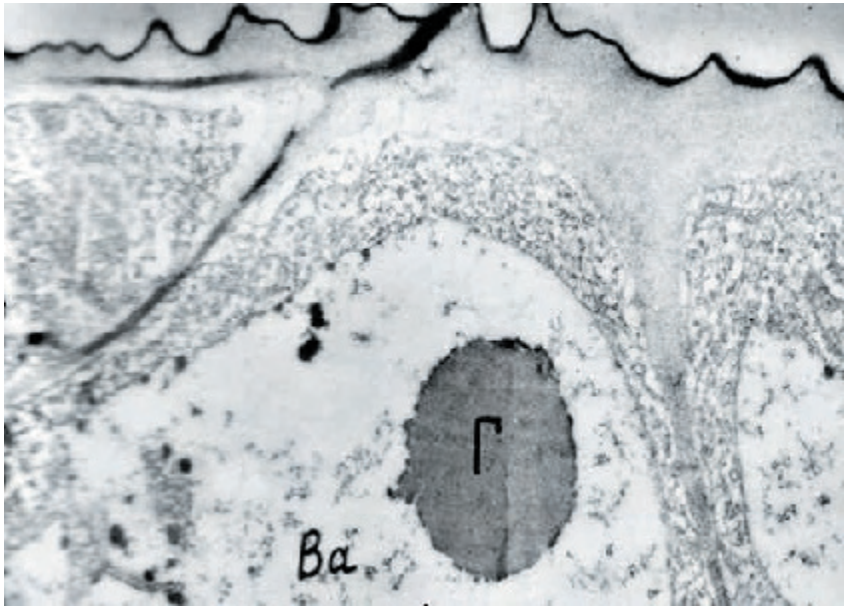


Рис. 1. Глобулярні включення у вакуолях меристематичних клітин. Зона розміром близько 30 мкм від верхівки.

Va – вакуоль, Г – глобули. Збільшення – 19000.

Особливий інтерес для розуміння механізму проникнення вірусів у клітини меристемних тканин викликає процес формування плазмодесм, які є своєрідними каналами розповсюдження вірусів у звичайних рослинних тканинах. Відсутність плазмодесм окремі дослідники пояснюють відсутністю вірусу в меристемній тканині [9].

Наші дослідження показали, що перші плазмодесми, ще не зовсім сформовані, виявляються вже в зоні близько 30 мкм, добре сформовані плазмодесми виявляли в зоні близько 60 мкм.

Із всіх досліджених вірусів досить легко виявляли МВК в меристематичних тканинах, починаючи із зони 80-90 мкм. Локалізація вірусних включень є доволі різною: загальною тенденцією є те, що віруси зустрічаються здебільшого біля ядра. Форма і розмір вірусних включень теж різні, від невеликих включень, до масових. Потрібно відмітити здатність М-вірусу утворювати кристалічні структури по типу паракристалів (рис.2). Як правило, такий спосіб локалізації в клітині характерний для жорсткопалочкоподібних вірусів і, зокрема, для вірусу тютюнової мозаїки.

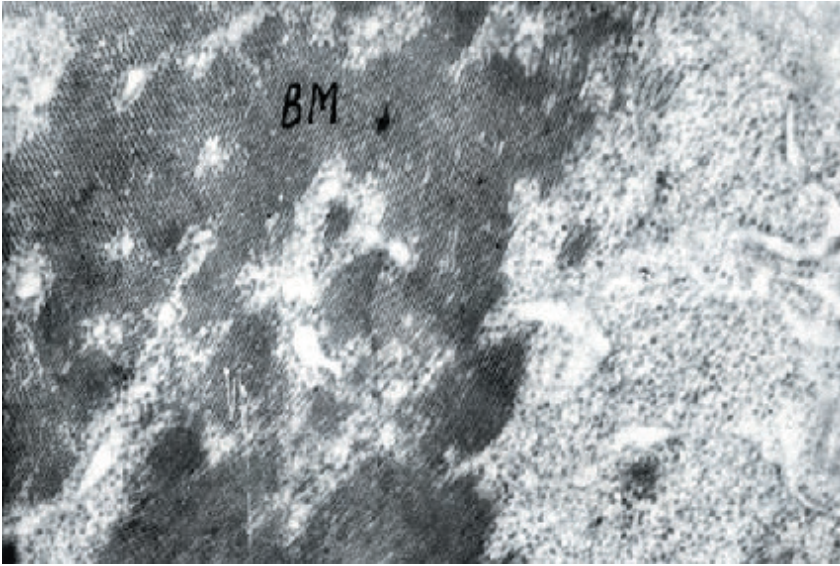


Рис. 2. Локалізація М-вірусу картоплі в клітинах меристемної тканини картоплі сорту Пекуровська.

ВМ – вірусні маси. Збільшення 63000.

У серійних зрізах рослин, вражених S-вірусом картоплі, вірусні включення були виявлені в зоні 90-95 мкм. Особливістю локалізації цього вірусу в уражених клітинах є тісний його зв'язок цього вірусу з хлоропластами. Вірусні маси зустрічаються також у цитоплазмі, головним чином у вигляді невеликих компактних агрегатів. X-вірус картоплі в ультратонких зрізах меристеми, як правило, виявляли в зоні 200-250 мкм, в окремих випадках — у зоні 130-150 мкм.

При виявленні вірусів у меристемах розміром від 66 до 375 мкм було апробовано експрес-метод. Він дозволяє зберегти життєздатність меристем і після аналізу використовувати їх для культивування на стерильному поживному середовищі. Нами було досліджено велику кількість меристем, виділених із різних сортів картоплі, враженої X-, M-, S-вірусами (див. табл.).

Таблиця. Результати виявлення X, S і M-вірусів у меристемах різних сортів картоплі експрес-методом

Сорт картоплі	Вірус	Загальна кількість меристем, шт.	Розміри уражених вірусами меристем, мкм			
			min*	max*	безвірусні	вірусні
Приєкульська рання	M	75	66	197	66	75
Пекуровська	M	15	66	179	78-80	83
Розана	S	22	88	158	88	94
Синьоглазка	X	30	200	375	375	200

*min, max – мінімальний та максимальний розмір виділених меристем.

Встановлено, що в меристемах розміром 66 мкм, виділених із картоплі сорту Пекуровська, MBK, SBK виявляється в меристемах картоплі сорту Розара розміром 94 мкм, ХВК – в меристемах картоплі сорту Синьоглазка розміром 200 мкм.

Аналіз отриманих даних свідчить, що M, S, X-віруси картоплі можуть локалізуватися на різних рівнях меристематичної тканини картоплі. З усіх досліджених меристем розміром до 100 мкм близько 50 % були безвірусними.

В результаті цих досліджень розроблено електронномікроскопічний експрес-метод визначення вірусів у меристемах, який дає можливість визначати безвірусну зону меристем. Метод може бути використаним для одержання безвірусного матеріалу. Він дозволяє зберігати життєздатність меристем і після аналізу використовувати їх для культивування на стерильному поживному середовищі.

Враховуючи те, що меристеми розміром менше 100 мкм погано приживаються на поживному середовищі, в практиці оздоровлення картоплі виділяють меристеми розміром близько 300 мкм, при цьому рослини піддають термообробці і хіміотерапії. Для оздоровлення сортів картоплі Альвара і Луговська від MBK ми використовували антивірусні речовини (ABP1, ABP2), похідні імідазотриазолу.

Дослідження з пошуку ефективної концентрації ABP1 проводили на сильнопатогенному і слабопатогенному штамах MBK, якими була інфікована картопля сорту Луговська. Визначили, що речовина ABP1 має антивірусну дію тільки при застосуванні її в концентрації 0,05 г/л.

Ефективність ABP1 і ABP2 (в концентрації 0,05 г/л) досліджували

на картоплі сорту Альвара, враженій МВК. Встановили, що АВР1 проявляє незначний фітотоксичний ефект, в той час як АВР2 не знижує приживлюваність меристем у порівнянні з контролем. Із застосуванням обох АВР регенерація рослин відбувається швидше, ніж в контролі, а ефективність оздоровлення збільшується до 80,0-83,3 % проти 33,3 % в контролі.

В ультратонких зрізах стеблових верхівок картоплі частки М та S-вірусів картоплі виявлено в зоні 90-100мкм. ХВК відстає від цих вірусів і знаходиться в зоні 200-250 мкм. В окремих випадках маси цього вірусу зустрічаються в зоні 130-150 мкм.

Загальна тенденція локалізації вірусу в клітинах меристеми нагадує локалізацію його в звичайних клітинах. Це свідчить про те, що в клітинах меристемної тканини іде активний синтез вірусу.

Використані нові антивірусні речовини АВР1 і АВР2, що є похідними імідазотриазолу, підвищують ефективність оздоровлення методом культури меристеми при застосуванні їх в концентрації 0,05 г/л, а також можуть збільшувати вихід безвірусних рослин до 83,8%, в порівнянні із контролем.

1. Шалабай В.И., Жук И.П. Величина терминальной безвирусной зоны у растений картофеля // Современные методы получения безвирусного картофеля. – М.: ВАСХНИЛ, 1975. – 96 с.

2. Рудишин С.Д. Основы биотехнологии растений. – Вінниця, 1998. – 224 с.

3. MacKinnon J.P., Munro J. Comparative rates of potato virus X into tubers and eyes of three potato varieties. // Am. potato J. – 1959. – №36. – P. 410-413.

4. Svobodova J. Freeing potato plants from virus. // 10th Intern. Bot. Congr. – Edinburg, 1964. – P.485-486.

5. Трускинов Э.В. Опыт оздоровления от вирусов коллекционных образцов картофеля путем культуры меристемной ткани // Современные методы получения безвирусного картофеля. – М.: ВАСХНИЛ, 1975. – 96 с.

6. Трофимец Л.Н., Хижняк П.А., Кучумов А.П., Методы лечения картофеля, зараженного вирусными болезнями. –М.: ВАСХНИЛ, 1978. – 64 с.

7. Жук И.П., Шалабай В.И., Коваленко А.Г. Пути повышения эффективности метода культуры меристем при оздоровлении картофеля от вирусных болезней // Современные методы получения безвирусного

картофеля. – М.: ВАСХНИЛ, 1975. – 96 с.

8. Уилки В. Электронная микроскопия для начинающих. – М.: Мир. – 1975. – С. 44-54.

9. Метьюз Р. Вирусы растений. – М.: Мир. – 1973. – 600 с.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ И ВЛИЯНИЕ ХИМИОТЕРАПИИ НА ПРОЦЕСС ОЗДОРОВЛЕНИЯ

Зарицкий Н.М., Петренко Е.Н.

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г. Чернигов

Провели исследования различных размеров апикальных меристем ряда сортов картофеля, инфицированных X, M и S-вирусами картофеля (ХВК, МВК, СВК), определили уровень проникновения этих вирусов в меристему. Изучили структуру апикальных меристем картофеля, пораженного вирусами, определили уровень залегания вирусных включений и характер внутриклеточной локализации M-вируса. Провели оздоровление 2 сортов картофеля методом культуры меристемы в комплексе с антивирусными веществами, производными имидазотриазола.

Ключевые слова: электронная микроскопия, ультратонкие срезы, вирусы картофеля, апикальные меристемы, культура ткани, химиотерапия.

INVESTIGATIONS OF POTATO APICAL MERISTEMS USING ELECTRON MICROSCOPE METHODS AND SANITARY EFFECT OF CHEMOTHERAPY

Zaritsky M.M., Petrenko O.M.

Institute of Agricultural Microbiology, UAAS, Chernihiv

The apical meristems of potato cultivars infected by potato virus X (PVX), potato virus M (PVM) and potato virus S (PVS) were analyzed by electron microscope methods. The meristem tissue structure on different levels, also endocellular localization of virions and virus inclusions were studied. Two cultivars of potato were sanitized by using a meristem-tip culture complete with chemotherapy with effect two new antiviral organic compounds derivative of imidazotriazol.

Key words: electron microscope, ultrathin sectioning, potato virus, apical meristems, tissue culture, chemotherapy.