

УДК: 635.24:632.937.16:576.8.077

Цитоанатомическое изучение изменений в тканях растений *Solanum tuberosum* и *Nicotiana tabacum* при поражении вирусной инфекцией

Хасанов В. Т., Муранец А. П., Бейсембина Б., Фида М. А.

Установлено, что действие вирусов на поражённое растение картофеля проявляется в остановке роста и деформировании клеток растений, изменении их структуры. В клубнях картофеля, поражённых вирусами, уменьшается количество и размеры крахмальных зёрен. Вирусосодержащий каллус, полученный из тест-растений, состоит из клеток удлинённой уродливой формы, содержащих аморфные включения.

Ключевые слова: вирусы картофеля, ИФА, картофель, *Nicotiana tabacum*, каллус.

Studying cyto-anatomical changes in tissues of virus infected *Solanum tuberosum* and *Nicotiana tabacum* plants

Khassanov V. T., Muranets A. P., Beisembina B., Fida M. A.

Virus impacts on affected by them potato plants appear in stunting, the plant cells deformation and changing their structure. In virus-affected potato tubers, reduces quantity and size of starch grains. Obtained virus-containing callus from the test-plants consist of elongated and malformed cells containing amorphous inclusions.

Keywords: potato viruses, ELISA, potato, *Nicotiana tabacum*, callus

Введение

Вирусные болезни картофеля широко распространены во всех зонах возделывания картофеля в Казахстане, при этом потери урожая могут достигать 50 % [8]. При поражении вирусами происходит видоизменение клеток растений картофеля во всех его органах, ухудшается качество клубней. Поражённость растений вирусной инфекцией во многом зависит от сортовых особенностей ана-

томического строения органов растений картофеля. Поэтому при селекционной работе картофеля необходимо учитывать реакцию растений на внедрение вирусной инфекции [9].

Цель исследования

Целью настоящих исследований являлось изучение цитоанатомических изменений в тканях растений *Solanum tuberosum* и *Nicotiana tabacum* при поражении вирусной инфекцией.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись проросшие клубни, листья и стебли картофеля сортов Латона, Романо, Кокшетауский ранний. В качестве тест-растений для накопления вирусной инфекции были использованы растения и каллусные ткани линий *Nicotiana tabacum* (*N. tabacum*).

Для получения первичной культуры каллуса использовались верхние молодые листья *N. tabacum*, которые отделяли, промывали дистиллированной водой и дезинфицировали, последовательно инкубируя их в 20 % эталоне (1 мин), 5 % растворе хлорной извести (15 мин) и 5 % растворе хлорамина (20 мин). Листья затем 3 раза промывали стерильной водой и разрезали на сегменты квадратной формы размером 0,5—0,7 мм.

Экспланты высаживали в чашки Петри с агаризованной питательной средой на минеральной основе по Мурасиге и Скуга (MS), содержащей наряду со стандартными ингредиентами следующие компоненты: кинетин — 2 мг/л, 2,4-Д — 0,5 мг/л, индолилуксусная кислота — 1 мг/л, сахароза — 2 % и агар-агар — 0,7 %. Каллус выращивали в условиях постоянного освещения (1500 лк), при температуре 25—26°C и 70 %-ной относительной влажности воздуха. Пассирование каллуса на свежую питательную среду осуществлялось через каждые 30 дней.

Пересадку первичной каллусной ткани проводили через 4 недели, при этом учитывались следующие показатели: число эксплантов, образующих каллус, интенсивность каллусогенеза, формирование морфогенного и неморфогенного каллуса, прирост сырой массы, цвет и консистенция.

Каллусные ткани *N. tabacum* тестировали методом двойного наслоения антител («сэндвич-вариант» ИФА) по стандартной методике [1, 3]. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (ASYS Expert 96, Австрия) при длине волны 492 нм. При проведении анализа применялись диагностические наборы для определения вирусов картофеля ГНУ Всероссийский НИИ картофельного хозяйства им. А. Г. Лорха РАСХН.

Срезы тканей растений картофеля делали с помощью салазочного микрометра, окуляр-микрометром определялась толщина перидермы, длина устьиц, размеры клеток хлоренхимы, крахмальных зёрен, проводилось морфометрическое изучение каллусных клеток [4].

Результаты и обсуждения

Изменения в растениях картофеля и табака при поражении вирусной инфекцией, обусловлены изменением физиологических процессов в растениях, что приводит к появлению патологических признаков, определяемых цитологическими и гистологическими анализами. Как правило, к числу морфологических признаков относят: посветление жилок листовой пластинки, появление мозаики, иногда накопление антоциана и жёлтых пигментов [5].

При изучении строения клеток основной паренхимы клубней картофеля здоровых и поражённых вирусной инфекцией различных сортов были выявлены следующие закономерности.

В коровой и сердцевинной паренхиме клубня в клетках изменялись размеры крахмальных зёрен. В клетках паренхимы клубня встречалось по 2—3 сложных и до 18 простых и полусложных зёрен с эксцентрической слоистостью. Размеры крахмальных зёрен в паренхиме клубней, поражённых вирусной инфекцией уменьшались, что более чётко проявлялось на размерах простых зёрен (таблица 1).

Таблица 1 — Характеристика крахмальных зёрен в клетках основной паренхимы клубней картофеля при $t_{05} = 2, 06$

Вариант	Количество крахмальных зёрен в клетке, шт.	Размеры крахмальных зёрен, мкм	
		Полусложные	Простые
Сорт Латона (безвирусные клоны) (контроль)	$18 \pm 1, 0$	$2, 5 \pm 0, 5$	$1 \pm 0, 3$

t_{ϕ}	18, 0	5, 0	3, 3
Сорт Латона (PVM+PVS)	$17 \pm 3, 0$	$2, 3 \pm 0, 3$	$0, 35 \pm 0, 5$
t_{ϕ}	5, 6	7, 6	0, 7
Сорт Латона (PVS)	$17 \pm 0, 5$	$2, 0 \pm 0, 5$	$0, 75 \pm 0, 5$
t_{ϕ}	34	4, 0	1, 5
Сорт Романо (безвирусные клоны) (контроль)	$17 \pm 0, 1$	$2, 5 \pm 0, 5$	$1, 5 \pm 0, 4$
t_{ϕ}	170, 0	5, 0	3, 8
Сорт Романо (PVM+PVS+PVX+PVA)	$16 \pm 2, 0$	$1, 5 \pm 0, 7$	$0, 5 \pm 0, 3$
t_{ϕ}	8, 0	2, 1	1, 6
Примечание: t_{05} — нормированное отклонение критерия Стьюдента при числе степеней свободы равном 24; t_{ϕ} — соотношение среднего арифметического к его абсолютной ошибке			

По таблице 1, количество и размеры крахмальных зерен безвирусных клонов сорта Латона превышали пораженные вирусами клоны, которые были очень мелкие и достигали 0, 35 мкм. Клоны картофеля сорта Романо, пораженных смесью вирусов, отличались наименьшим количеством крахмальных зерен в клетке и их размеры не превышали 0, 5—1, 5 мкм по сравнению с контролем.

По камбиальному кольцу клубня картофеля располагались проводящие пучки. Основную массу клубня составляли паренхима внутренней флоэмы, перимедуальной зоны сердцевины и собственно сердцевина. Паренхима клубня имела узкую полосу мелких меристематических клеток, к наружной части от которой, располагались несколько ситовидных трубок, во внутрь, от 1 до 6 слабо развитых сосуда, что соответствует данным научной литературы [2]. В наших исследованиях в поражённых вирусной инфекцией клубнях картофеля в анатомическом строении проводящих тканей изменений не выявлено.

В связи с нарушением ростовых процессов в растениях картофеля при поражении вирусами могут изменяться размеры его клеток [7]. Нами была выявлена закономерность в размерах покровных тканей у сортов свободных от инфекции и несущих комплекс вирусной инфекции. Как известно размеры и особенности покровной ткани клубней картофеля напрямую связаны с процентом гибели их при хранении [6]. В ходе исследований нами установлено, что перидерма состояла из таблитчатых клеток, расположенных параллельными рядами, оболочки её покрывались пробкой, межклетники отсутствовали. Толщина клеток перидермы изменялась от 35 до 45 мкм. Как видно из таблицы 2 при поражении вирусной инфекцией уменьшались число слоёв пробки и размеры перидермы.

Таблица 2 — Характеристика клеток перидермы клубня картофеля при $t_{05} = 2, 09$

Вариант	Число слоёв клеток, шт.	Размеры перидермы, мкм
Сорт Латона (безвирусные клоны) (контроль)	$8, 0 \pm 0, 5$	$45 \pm 0, 75$
t_{ϕ}	16, 0	60, 0
Сорт Латона (PVM+PVS)	$7, 5 \pm 0, 1$	$38 \pm 0, 5$
t_{ϕ}	75, 0	76, 0
Сорт Латона (PVS)	$7, 8 \pm 0, 1$	$40 \pm 2, 5$
t_{ϕ}	78, 0	16, 0
Сорт Кокшетауский ранний (безвирусные клоны) (контроль)	$5, 9 \pm 0, 2$	$37 \pm 0, 8$
t_{ϕ}	29, 5	46, 3
Сорт Кокшетауский ранний (PVM+PVS+PVX)	$5, 5 \pm 0, 5$	$35 \pm 0, 5$
t_{ϕ}	11, 0	70, 0
Примечание: t_{05} — нормированное отклонение критерия Стьюдента при числе степеней свободы равном 19; t_{ϕ} — соотношение среднего арифметического к его абсолютной ошибке		

Анализ эпидермальных клеток проростков поражённых растений картофеля показал, что эпидермис клеток картофеля состоял из прозенхимных клеток. Отмечалось увеличение количества кроющих трихом на эпидермисе вирусных растений. Ядро было расположено по периферии клетки эпидермиса. Все клетки первичной покровной ткани имели антоциановое окрашивание.

У клеток эпидермиса листьев, поражённых вирусной инфекцией, наблюдалось измельчение клеток, недостаточное развитие. На срезах листьев, поражённых вирусной инфекцией, наблюдалось меньшее количество слоёв столбчатой и губчатой паренхимы. Уменьшались размеры хлоропластов в поражённых вирусами листовых пластинках. В листьях растений картофеля, поражённых вирусом, наблюдалось уменьшение слоёв палисадной хлоренхимы. В клетках хлоренхимы, поражённых вирусами растений картофеля, наблюдалось уменьшение размеров ядра, увеличивались размеры вакуолей. Количество хлоропластов в клетках снижалось по сравнению с клетками здоровых растений, встречались аморфные включения неопределённой формы.

В целях сравнительного изучения анатомических изменений в тест-растениях *N. tabacum* нами были проведены исследования каллусной ткани этого растения. В таблице 3 представлены результаты детекции вируса PVY в клетках каллуса методом ИФА (таблица 3).

Таблица 3 — Результаты тестирования каллуса *Nicotiana tabacum* вирусом картофеля PVY

Вариант	Оптическая плотность ИФА, ед.
Безвирусный каллус (контроль)	0,083
Каллус, инфицированный PVY	0,313
Positive	0,238
Negative	0,031
m %	1,44
HSP (05)	0,01

Результаты тестирования каллуса *N. tabacum* подтвердили отсутствие инфекции на варианте безвирусного каллуса. Оптическая плотность каллуса, инфицированного PVY, несколько превышала значение позитивного контроля.

В ходе проводимых исследований нами была изучена каллусообразующая способность каллусных культур, индуцированных в зависимости от зараженности PVY (таблица 4).

Таблица 4 — Индукция каллусогенеза из листовых эксплантов *Nicotiana tabacum* на 10-е сутки при $t_{05} = 2,09$

Вариант	Исходное количество эксплантов, шт.	Количество эксплантов образовавших каллус, шт.	Каллусообразующая способность, %
Безвирусный каллус (контроль) t_{ϕ}	$60 \pm 1,0$ 60,0	$58 \pm 1,0$ 58,0	98 -
Каллус, инфицированный PVY t_{ϕ}	$120 \pm 3,0$ 40,0	$114 \pm 3,0$ 38,0	95 -
Примечание: t_{05} — нормированное отклонение критерия Стьюдента при числе степеней свободы равном 19; t_{ϕ} — соотношение среднего арифметического к его абсолютной ошибке			

В соответствии с данными таблицы 4, на десятые сутки культивирования листовых эксплантов на питательной среде MS, оба варианта изучаемых эксплантов показали высокий процент каллусогенеза.

Каллусная ткань была окрашена в зеленый цвет в связи с культивированием в условиях постоянного освещения. За время эксперимента было осуществлено 4 пассажа, в ходе которых проводились наблюдения за интенсивностью нара-

тания каллусной ткани. Результаты интенсивности роста безвирусных и инфицированных PVY каллусных культур *N. tabacum* представлены в таблице 5.

Таблица 5 — Интенсивность роста пораженных PVY каллусных культур *N. tabacum* $t_{05} = 2,09$

Вариант	Сырая масса 1, г	Сырая масса 2, г	Интенсивность роста, %
Безвирусный каллус (контроль) t_{ϕ}	$0,103 \pm 0,01$ 10,3	$0,235 \pm 0,03$ 7,8	128 -
Каллус, инфицированный PVY t_{ϕ}	$0,085 \pm 0,01$ 8,5	$0,176 \pm 0,03$ 5,9	107 -

Примечание: t_{05} — нормированное отклонение критерия Стьюдента при числе степеней свободы равном 19; t_{ϕ} — соотношение среднего арифметического к его абсолютной ошибке

Полученные результаты свидетельствовали, что интенсивность нарастания безвирусного каллуса на 21 % выше, чем каллусной ткани пораженного PVY.

При микроскопическом исследовании изучаемых вариантов опыта было выявлено, что при метаморфозе глобулярной ткани в рыхлую, ранее плотно связанные друг с другом меристематические клетки глобулярного каллуса обособлялись и увеличивались в размерах (рисунок 1).



Рисунок 1 — Каллус растений и клетки глобулярного каллуса *Nicotiana tabacum* (x100, x600)

Для выяснения клеточных основ длительного сохранения тотипотентности изучали гистологическое строение длительно культивируемых рыхлых каллусов. Вирусосодержащий морфогенный каллус табака состоял из клеток сферической или слегка овальной формы (длиной 6 мкм, шириной 2,6 мкм). В некото-

рых клетках имелись кристаллы, ядро располагалось в центре клетки, или было слегка сдвинуто к периферии. Некоторые клетки каллуса удлинялись (длина до 15, 8 мкм, ширина — 2, 7 мкм) и прорастали в длинные трубкообразные образования, с крючкообразными и сосочковидными выростами, в этих клетках ядро располагалось на периферии клетки, в центре клетки располагалась крупная вакуоль. Более мелкие клетки имели округлую форму. Встречались также клетки неправильной формы (уродливые). Размеры клеток вирусосодержащего и безвирусного морфогенного каллуса были практически одинаковы.

Научной новизной полученных результатов является изучение новых особенностей цитоанатомических изменений в тканях растений *Solanum tuberosum* и *Nicotiana tabacum* в зависимости от поражения вирусами.

Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности применения установленных типов реакций растений в селекционном процессе при испытании сортов картофеля на устойчивость к вирусам.

Выводы

1. Всего было изучено около 500 образцов растений картофеля и табака.
2. Действие вирусов на поражённое растение картофеля проявляется остановкой роста и деформированием клеток растений, изменением их структуры.
3. В клубнях картофеля, поражённых вирусной инфекцией, уменьшается количество и размеры крахмальных зёрен.
4. Перидерма клубней картофеля, поражённых вирусной инфекцией, имеет размеры на 15 и более процентов меньше, чем у здоровых растений, число её слоёв также снижается.
5. Каллусообразующая способность листовых эксплантов *N. tabacum* не зависит от зараженности PVY. Интенсивность роста безвирусного каллуса на 21 % выше, чем каллуса, инфицированного PVY.
6. Вирусосодержащий морфогенный каллус табака состоит из клеток удлиненной, часто уродливой формы, некоторые содержат аморфные включения.

Литература

1. Анисимов Б. В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля: практическое руководство. — М.: ФГНУ Росинформагротех, 2004. — С. 3—18.
2. Вавилов П. П. Растениеводство. — М.: Колос, 1986. — 519 с.
3. Контроль качества и сертификация семенного картофеля: Практическое руководство. — М.: ФГНУ Росинформагротех, 2003. — С. 157—174.
4. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 270 с.
5. Попкова К. В. Болезни картофеля. — М.: Колос, 1980. — 303 с.
6. Попкова К. В., Качалова З. П. Практикум по иммунитету растений. М.: Колос, 1984, 176 с.
7. Попкова К. В. Общая фитопатология. — М.: Дрофа, 2005. — 445 с.
8. Хасанов В. Т., Муранец А. П., Оразбаева Г. К., Букаев А. Инокуляция, накопление и идентификация вируса PVY картофеля в тест-растениях *Nicotiana tabacum*// Вестник КАТУ им. С.Сейфуллина. — 2012, №4 (75). — С. 31—36.
9. Швидченко В. К., Созинова Л. Ф. Оздоровление, размножение и диагностика в картофелеводстве. — Астана, 2000. — 163 с.

Literature

1. Anisimov B. V. Fitopatogennye virusy i ikh kontrol v semenovodstve kartofelya: prakticheskoe rukovodstvo. — М.: FGNU Rosinforagrotekh, 2004. — S. 3—18.
2. Vavilov P. P. Rastenievodstvo. — М.: Kolos, 1986. — 519 s.
3. Kontrol kachestva i sertifikatsiya semennogo kartofelya: Prakticheskoe rukovodstvo. — М.: FGNU Rosinformagrotekh, 2003. — S. 157—174.
4. Pausheva Z. P. Prakticum po tsitologii rastenii. — М.: Agropromizdat, 1988. — 270 s.
5. Popkova K. V. Bolezni kartofelya. — М.: Kolos, 1980. — 303 s.
6. Popkova K. V., Kachalova Z. P. Prakticum po иммунитету rastenii. М.: Kolos, 1984, 176 s.
7. Popkova K. V. Obshaya fitopatologiya. — М.: Drofa, 2005. — 445 s.
8. Khasanov V. T., Muranets A. P., Orazbaeva G. K., Bukayev A. Ivokulyatsiya, nakoplenie i identifikatsiya virusa PVY kartofelya v test-rastenyakh *Nicotiana tabacum* // Vestnik KATU im. S. Seifullina. — 2012, №4 (75). — S. 31—36.
9. Shvidchenko V. K., Sozinova L. F. Ozdorovlenie, razmnozhenie i diagnostika v kartofelevodstve. — Astana, 2000. — 163 s.

