

УДК 578.85/86

О. Камзел, магістр 2-го року, С. Петренко, пров. інж.,
І. Будзанівська, канд. біол. наук, О. Шевченко, канд. біол. наук

КОРЕЛЯЦІЯ МІЖ ВМІСТОМ ЦИНКА ТА ЕФЕКТИВНІСТЮ РЕПЛІКАЦІЇ ВІРУСА ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ У РОСЛИНАХ ТЮТЮНУ

Проаналізовано взаємозв'язок між накопиченням рослинами тютюну важкого металу цинка та ефективністю репродукції вірусу тютюнової мозаїки. Продемонстровано, що підвищення концентрації вірусу у тканинах інфікованих рослин, вирощених у штучно контамінованому цинком ґрунті, є прямим наслідком накопичення цинка у надземній частині дослідних рослин.

Relationships between zinc accumulation in tobaccos and efficiency of Tobacco mosaic virus replication were analyzed. It was established that increase of virus concentration in tissues of infected plants grown in artificially Zn-contaminated soil is a direct consequence of zinc content elevation in above-ground part of experimental plants.

Вступ. Більшість сільськогосподарських земельних угідь значно забруднені хімічними сполуками. Особливе місце серед контамінантів посідають важкі метали, які мають тенденцію до поступового накопичення у ґрунтах внаслідок промислової, транспортної активності та агро меліоративних заходів [7], і чинять негативний фізіологічний вплив на ріст та розвиток рослин [3].

Окрім того, нагальною проблемою сучасного сільськогосподарства є значні втрати врожаю внаслідок поширення фітовірусних інфекцій та відсутності засобів їх контролю. Виходячи з вищенаведеного зрозуміло, що в агроценозах України є типовою ситуація, при якій відбувається інфікування вірусом рослини, яка вже зазнає впливу інших стресових чинників, наприклад, важких металів.

Одночасна дія важких металів та вірусної інфекції, як продемонстровано у декількох модельних системах "рослина-вірус-важкий метал", характеризується, скоріше, адитивним типом взаємодії стосовно рослинного організму, тобто викликає більш значні негативні функціональні зміни у порівнянні зі впливом кожного фактору окремо [2]. Окрім того, у рослинах родини *Solanaceae*, які зростають у ґрунті, штучно контамінованому важкими металами, реплікація типових вірусів відбувається більш ефективно (суворіший прояв системних симптомів вірусної інфекції, вищий вміст вірусу у рослині) [11]. Логічним постає питання про потенційну залежність реплікації вірусів від вмісту важких металів у тканинах рослин, що у разі позитивної кореляції свідчитиме про нагальність проблеми вирощування сільськогосподарських рослин на контамінованих важкими металами територіях.

Дана робота присвячена дослідженню реплікації вірусу тютюнової мозаїки (BTM) в рослинах тютюну та накопичення ними важкого металу цинка.

Об'єкти та методи досліджень. В експериментах були задіяні вірус тютюнової мозаїки (BTM, типовий штам U1) [ICTV Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>] та рослини тютюну *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, які системно реагують на інюкуляцію даним штамом BTM із розвитком яскравих симптомів мозаїки та подальшої деформації листків [VIDE Database, <http://image.fs.uidaho.edu/vide/refs.htm>].

Проростки рослин вирощувалися у теплицях у стерильному ґрунті за стандартних умов освітлення, вологості та температури.

Важкий метал цинк вносився у ґрунт прикоренево (проростки на стадії 3 справжніх листків) у формі водорозчинної солі ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) у концентрації, що відповідала 5 гранично допустимим концентраціям (ГДК) з розрахунку на масу ґрунту [4].

Інокуляція дослідних рослин вірусом проводилася механічно втиранням вірусного препарату (концентрація інокуляту становила 100 мкг/мл) за допомогою карборунду та скляної палички на стадії 4 справжніх листків [9].

Дослідження концентрації BTM у рослинах тютюну проводилося методом непрямого імуноферментного

аналізу за стандартною методикою [1] з використанням поліклональної кролячої антисироватки, специфічної до BTM U1 (кафедра вірусології, КНУ ім. Тараса Шевченка), та антивидових козлиних антикролячих антитіл, мічених лужною фосфатазою (Sigma, USA). Реєстрація результатів ІФА проводилася при довжині хвилі 405 нм з використанням ІФА-рідера "Dynatech". Для опосередкованого визначення вмісту BTM у литках тютюну проводилося порівняння оптичної густини відповідних зразків однакової ваги.

Для визначення вмісту цинку у рослинних тканинах застосовувалася атомна адсорбційна спектроскопія (ААС). Методика була складена на основі загальноприйнятих стандартів [5, 6].

Статистична обробка даних проводилася за стандартними процедурами за допомогою програмного пакету MS Excel 2003.

Результати та їх обговорення. Попередні експерименти у модельних системах "*Lycopersicon esculentum* – BTM" та "*Solanum tuberosum* – X-вірус картоплі" показали, що за умов штучного внесення важких металів, і особливо цинку, у ґрунт (концентрації 5-10 ГДК) спостерігається значна інтенсифікація у накопиченні вірусів за результатами ІФА у порівнянні з вірус-інфікованими рослинами, що зростали у стерильному ґрунті. Зокрема, у системі "*Lycopersicon esculentum* – BTM" цинк індуктував збільшення вмісту BTM приблизно у 2,3 рази [10], а концентрації ХВК у рослинах картоплі – у 2,5 рази [11].

Метою даної роботи був порівняльний аналіз накопичення рослинами тютюну антигенів вірусу та іонів цинку. У роботі була використана модельна система із використанням рослин *Nicotiana tabacum* cv. Samsun, які реагують системно на інфекцію BTM. При аналізі розвитку вірусної інфекції на тютюні було виявлено, що у контрольних BTM-інфікованих рослинах симптоми з'явилися на 19 добу після інфікування (дпі). Вірус-індуковані симптоми характеризувалися розвитком типової мозаїки листків з їх наступною деформацією на пізніх стадіях розвитку вірусної інфекції. Розвиток вірус-специфічних симптомів у рослин, які вирощувалися у ґрунті з додаванням цинку, спостерігався лише на 23 добу після інфікування (затримка у 4 доби). Таким чином, внесення у ґрунт цинку у концентрації 5 ГДК призводило до затримки появи візуальних симптомів, індукованих BTM на дослідних рослинах тютюну, що узгоджується з експериментальними даними попередніх досліджень [2, 8, 11].

Вміст антигенів BTM у рослинних тканинах аналізувався методом ІФА. Отримані дані з накопичення рослинами вірусу тютюнової мозаїки на 7 день після інфікування (дпі) продемонстрували підвищення вмісту вірусу в інфікованих рослинах, які вирощувалися при металічному стресі, приблизно у 1,3 разу у порівнянні з BTM-інфікованими контрольними рослинами (рис. 1).

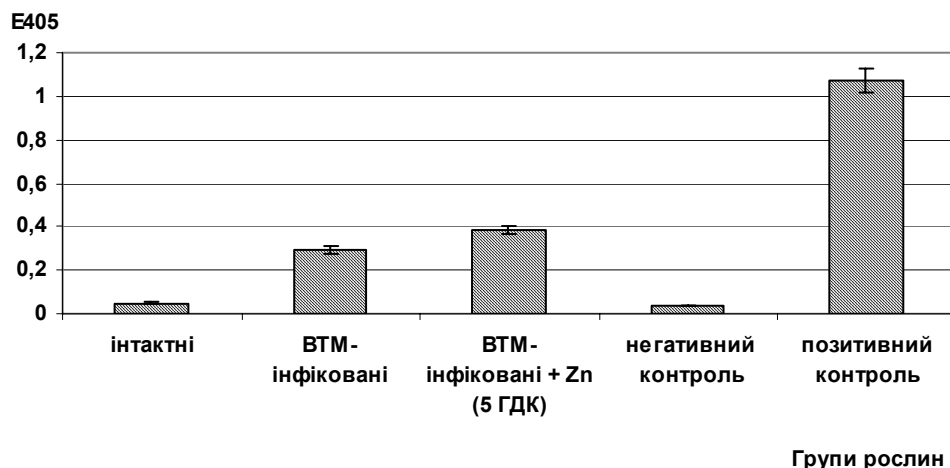


Рис. 1. Вміст BTM у рослинах *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (7 дні). Під негативним та позитивним контролем розуміють внутрішні контролю ІФА

Таким чином, наведені результати узгоджуються з нашими попередніми дослідженнями щодо індукуючого впливу важких металів на накопичення вірусних антигенів в інюльованих рослинах [10, 11].

Для вивчення динаміки накопичення важкого металу цинку даними інфікованими рослинами був використаний метод AAC із застосуванням вологої мінералізації рослинного матеріалу. На Рис. 2 представлені результати даного дослідження.

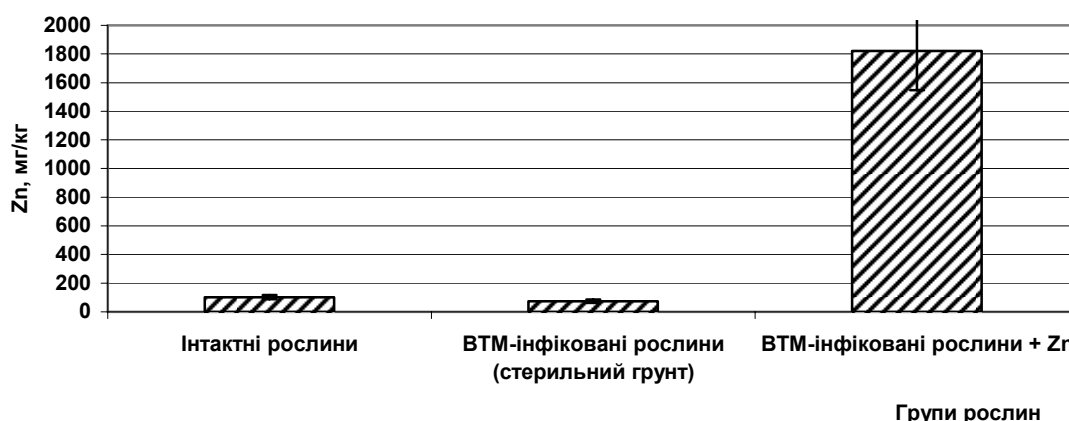


Рис. 2. Вміст цинку у рослинах *Nicotiana tabacum* cv. Samsun (7 дні)

Як видно з діаграми, BTM-інфіковані рослини, що зростали у стерильному ґрунті (без штучного додавання цинку) накопичували цинк статистично однаково з інтактними рослинами. Внесення цинку у ґрунт до кінцевої концентрації 5 ГДК з розрахунку на масу ґрунту індукувало дуже значне підвищення вмісту даного металу у вірус-інфікованих рослинах – у 130–160 разів. Причини такої високої концентрації цинку в оброблених рослинах, ймовірно, пояснюються двома причинами. По-перше, дослід проводився у закритих лабораторних умовах; рослини вирощувалися у посуді без дренажу. Таким чином, на противагу природним умовам, корені рослин перебували у постійному "контакті" з іонами цинку, оскільки останні не мали змоги дифундувати у нижчі шари ґрунту та вимиватися водою при поливі. Крім того, відомо, що рослини у лабораторних умовах є більш сприйнятливими до металевого стресу. По-друге, цинк є високомобільним елементом як у ґрунті, так і в рослині. За літературними даними відомо, що молоді рослини вельми інтенсивно накопичують даний метал надземній частині [4, 7].

Висновки. Виходячи з отриманих результатів, вперше продемонстрована позитивна кореляція між високим вмістом цинку у рослинах тютюну та їх здатністю до більш ефективного накопичення білкових продуктів вірусу тютюнової мозаїки. Невідомо, чи поширюється дана

закономірність на модельні системи із залученням інших вірусів чи рослин-хазяїв, або ж інших важких металів, тому дана тематика потребує подальших досліджень.

1. Антитела 1. Методы / Под ред. Д. Кэйти. – М.: Мир, 1991. – 196 с.
2. Будзанівська І.Г., Поліщук В.П., Бойко А.Л. Вплив підвищених концентрацій важких металів у ґрунті на розвиток вірусної інфекції в агроценозах та лабораторних умовах // Доп. Нац. Акад. Наук України. – 2000. – № 11. – С. 199–203.
3. Гуральчук Ж.З. Механизмы устойчивости растений к тяжелым металлам // Физиология и биохимия культурных растений. – 1994. – Т. 36. – № 2. – С. 107–117.
4. Кабата-Пендиас А., Пендиас Х. Микроэлементы в почвах и растениях. – М.: Мир, 1989. – 439 с.
5. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельскохозяйственных и продукции растениеводства. Издательство стандартов. – М., 1992.
6. Сырье и продукты пищевые. Методы определения токсичных элементов. ГОСТ 269(27-35) – 86. Издательство стандартов. – М., 1986.
7. Шевченко О.В., Будзанівська І.Г., Патица В.П., Бойко А.Л., Поліщук В.П. Вплив важких металів на перебіг вірусних інфекцій рослин. – К.: Фітоцентр, 2003. – 224 с.
8. Шевченко О.В., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П., Поліщук В.П. Перебіг вірусної інфекції рослин *Lycopersicon esculentum* при високих концентраціях важких металів // Мікробіологічний журнал. – 2004. – Т. 66. – № 3. – С. 80–88.
9. Hill S.A. Methods in plant virology. – Oxford: Alden Press, 1984. – 167 p.
10. Shevchenko O.V., Budzanivska I.G., Shevchenko T.P., Polischuk V.P., Spaar D. Plant virus infection development as affected by heavy metal stress // Archives of Phytopathology and Plant Protection. – 2004. – Vol. 37. – P. 139–146.
11. Shevchenko O.V., Kamzel O.A., Budzanivska I.G., Shevchenko T.P., Spaar D., Polischuk V.P. Heavy metal soil contamination delays the appearance of virus-induced symptoms on potato but favours virus accumulation // Archives of Phytopathology and Plant Protection (In press).

Надійшла до редколегії 10.03.07