

ФОРМИРОВАНИЕ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ БАРЬЕРОВ СЕМЯЗАЧАТКА *PHASEOLUS VULGARIS* L. В СИСТЕМЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ

А.Ф. ЛИХАНОВ¹, И.А. АНТИПОВ², Е.В. ГРИНЧУК², И.В. ДРАГОВОЗ³

¹ Институт эволюционной экологии НАН Украины
03143, Украина, Киев, ул. Академика Лебедева, 37

² Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины
03041, Украина, Киев, ул. Героев Оборона, 15

³ Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
03134, Украина, Киев, ул. Академика Заболотного, 154

E-mail: igordragovoz@ukr.net

Формирование семян фасоли при системном заражении растений вирусами обыкновенной мозаики фасоли сопровождается интенсивным отложением каллозы и лигнина в зонах нуцеллярного, интегументального и микропилярного тканевых барьеров, препятствующих проникновению вирусов. При высокой концентрации вирусных частиц происходит деградация тканей семязачатков с проявлением типичной реакции сверхчувствительности растений. В цитоплазме и ядрах клеток развивающихся зародышей выявлены диффузные зернистые вирусные включения. По особенностям строения васкулярной системы и тканей семязачатка, а также локализации вирусных включений в тканях формирующихся семян установлены вероятные пути транспорта вирусов.

Ключевые слова: фасоль обыкновенная, семязачаток, интегумент, нуцеллус, зародыш, транслокация, вирус обыкновенной мозаики фасоли, вирусные включения.

Введение. Передача вирусов семенами – распространенный способ заражения растений [1–4]. Вирусные частицы в семенах могут быть локализованы как в зародышах, так и в семенной кожуре [2]. В зрелых семенах они выявляются значительно реже, чем в развивающихся семязачатках. Для вируса желтой мозаики фасоли (ВЖМФ, *Bean yellow mosaic virus*) известны случаи, когда вирусные частицы выделялись из формирующихся зародышей *Phaseolus vulgaris* L., однако, не обнаруживались в зрелых семенах [2]. Показана также тенденция к уменьшению количества инфицированных семян при их длительном хранении [2]. В семенах устойчивость вирусов к высоким температурам значительно выше, чем в вегетативных органах

растений [5]. Так, например, вирус желтой мозаики фасоли выдерживает термообработку семян до 100 °С, но легко элиминируется при незначительном нагревании растений в культуре *in vitro* [1, 2]. Причины повышенной устойчивости вирусов в семенах мало изучены и все еще сложны для понимания. Существует мнение, что это явление обусловлено, прежде всего, общим стабилизирующим действием специфического структурно-молекулярного состава семян, в частности низким содержанием воды и высокой концентрацией белков [1].

Среди вирусов, передающихся семенами, в плане подбора модельных систем: семя – репродуктивная сфера растения – фитовирусы, значительный интерес представляют вирусы желтой и обыкновенной мозаики фасоли. Это одни из самых распространенных фитопатогенов, поражающих растения сем. *Fabaceae* и представителей других семейств [2, 4, 6–9].

В отношении семян лишь некоторые виды заражаются ВЖМФ. По существующим данным, у растений кормовых бобов, инфицированных ВЖМФ, от 0,1 до 12,0 % семян содержат вирусные частицы, у фасоли обыкновенной – до 40 %, у разных видов люпина – до 60 %. Имеются единичные сообщения о передаче ВОМФ (*Bean common mosaic virus*) семенами *Pisum sativum* L. и *Melilotus alba* Medik [2], однако эти данные нуждаются в проверке.

Известно, что активный межклеточный транспорт элементов вирусного генома осуществляется посредством транспортных белков, кодируемых вирусом [10]. При смешанных инфекциях возможно явление комплементации транспортной функции, в результате которой зависимые вирусы, используя транспортные белки вируса-помощника, преодолевают межтка-

невые барьеры и распространяются по всему растению [11]. Однако, принимая во внимание значительные успехи в раскрытии механизмов сборки и транспорта вирусов растений [10, 11], следует отметить, что ключевые результаты были получены при исследовании вегетативных органов растений [12, 13]. При этом структурная организация и развитие семязачатков инфицированных растений, а также проблема распространения вирусов семенами мало изучены. В этой связи особый интерес представляют исследования структурной организации семязачатков, их потенциальной способности препятствовать проникновению вирусов в формирующиеся семена, а также наличие вирусных включений в тканях семязачатков, семян, зародышей и эндосперма.

Объект и методы исследований. Исследование структурной организации и развития семязачатков, особенностей транспорта вирусных частиц в тканях инфицированных растений проводили на нативном и фиксированном материале *Phaseolus vulgaris*. Модельные растения фасоли сорта «Первомайская» получали из здоровых и инфицированных ВОМФ семян в контролируемых условиях при 20–23 °С и 16-часовым фотопериодом. Основным объектом исследований служила система переноса фитовирусов из семян зараженных растений в вегетативные органы и семязачатки растений новой генерации.

Экстракцию суммарной РНК проводили по стандартной методике [14]. Реакционная смесь для проведения полимеразной цепной реакции объемом 15 мкл содержала 1 × ПЦР буфер с 1,5 мм MgCl₂ («AmpliSens», Россия), 0,2 мм дезоксинуклеозидтрифосфата (дНТФ) («AmpliSens», Россия), 1 пкмоль каждого из олигонуклеотидных праймеров (F – 5'-tgtggtacaatgctgtgaagg-3', R – 5'-gccttcactgtgctactgct-3', размер продуктов амплификации 391 п.н.) [15], 10–40 нг кДНК, 0,5 U Taq-полимеразы («AmpliSens», Россия). Условия проведения ПЦР анализа: начальная денатурация кДНК при температуре 94 °С – 5 мин; денатурация кДНК 94 °С – 30 с, отжиг праймеров 60 °С – 30 с, элонгация 72 °С – 30 с; конечная элонгация 72 °С – 7 мин. Количество циклов – 35.

Реакцию амплификации проводили в ДНК-амплификаторе «Терцик» ТП4-ПЦР-01. Ре-

зультаты ПЦР визуализировали УФ-лучами трансиллюминатора (Т-312-С).

Цитологические и анатомические исследования растительных тканей выполняли на постоянных микропрепаратах толщиной 7–10 мкм. Материал для эмбриологических исследований 24 ч обрабатывали фиксатором Чемберлена [16]. Срезы тканей окрашивали железным гематоксилином по Гейденгайну [17]. Вирусные включения выявляли методом флуоресцентной микроскопии с применением акридинового оранжевого (разбавление – 1 : 10000) [18]. Время окрашивания флуорохромом (при рН – 5,6) и последующей отмывки тканей семязачатков в дистиллированной воде – 5 мин. Флуоресценцию нуклеиновых кислот в клетках гасили 5%-ной трихлоуксусной кислотой (ТХУ). Для этого еще неокрашенные срезы обрабатывали ТХУ 15 мин на водяной бане при 90 °С [18]. Для изучения клеточных оболочек ткани семязачатков окрашивали корифосфином (1 : 1000). Отложения каллозы определяли по ее флуоресценции с анилиновым синим.

Определение вирусов и их локализацию в тканях симптомных растений проводили методом электронной микроскопии с использованием медных сеточек с формваром. Препарат контрастировали 2%-ным раствором уранил ацетата и исследовали на электронном трансмиссионном микроскопе JEM 1400.

Фотодокументацию материалов и цифровую обработку данных выполняли в программе AxioVision 40V Carl Zeiss. Обработку данных гистохимических исследований выполняли в специализированной программе для анализа цифровых изображений – Image-Pro Premier 9.0 (USA).

Результаты и обсуждение. В полевых условиях ВОМФ вызывает у растений-хозяев патологические изменения листьев мозаичного типа. Болезнь иногда сопровождается различными деформациями листовых пластинок, а в некоторых случаях прогрессирующим хлорозом и некротической пятнистостью.

В модельном эксперименте характерные признаки патогенеза были обнаружены у проростков *Phaseolus vulgaris*, выращенных из семян, инфицированных ВОМФ, в фазе формирования первых настоящих листьев. Листовые пластинки инфицированных растений имели

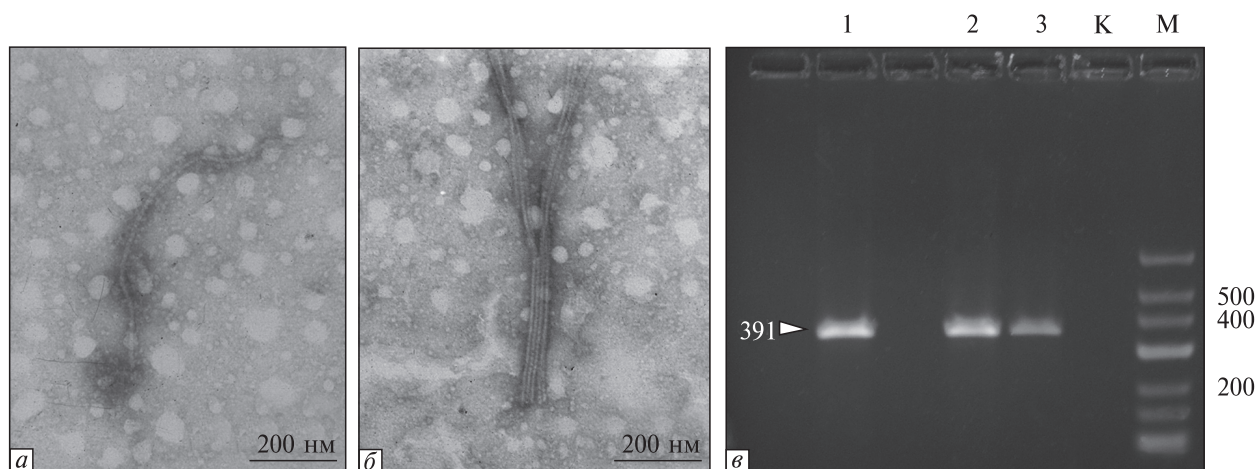


Рис. 1. Вирусы обыкновенной мозаики в формирующихся бобах фасоли обыкновенной: *a* – одиночный вирион, обнаруженный в тканях формирующегося семени (СМ); *б* – группа вирусных частиц, выявленная в околоплоднике (ОК); *в* – электрофореграмма ампликонов размером 391 п.н., К – отрицательный контроль; М – маркер молекулярных масс GeneRule SM1193™

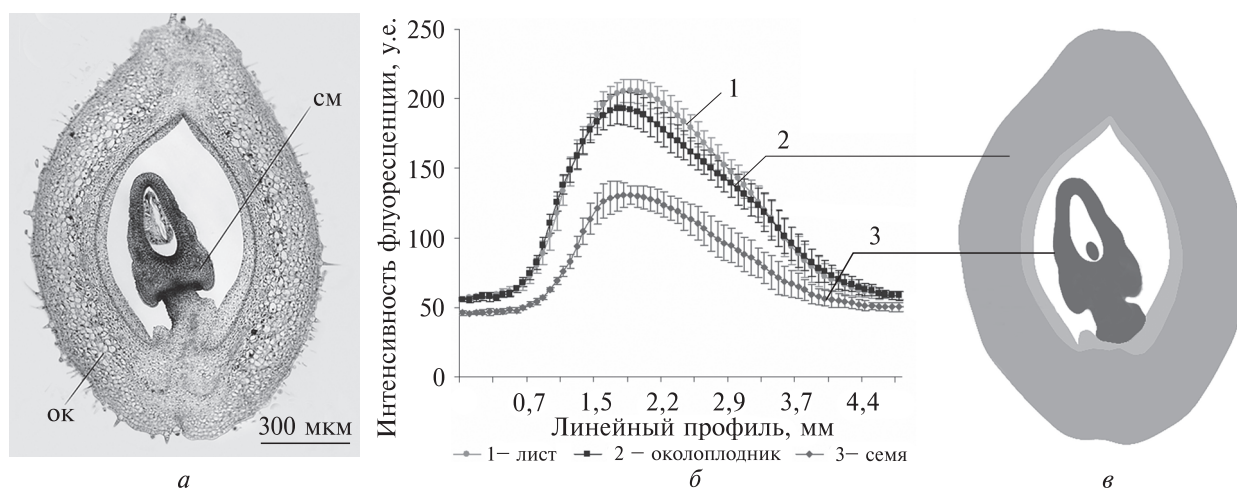


Рис. 2. Распределение вирусной нагрузки на ткани околоплодника и семян фасоли с учетом тканевых барьеров: *a* – поперечный срез формирующегося плода фасоли: ок – околоплодник, см – оплодотворенный семязачаток; *б* – показатели интенсивности флуоресценции продуктов амплификации ПЦР, полученные из инфицированных вирусами листьев (1), околоплодника (2) и формирующихся семян (3); *в* – схема распределения вирусной нагрузки на формирующийся плод

признаки нарушения пигментации. На стадии закладки первых генеративных почек на поверхностях листьев вдоль жилок первого и второго порядков появлялись хорошо выраженные хлоротичные пятна, площадь которых постепенно увеличивалась. На стадии завязывания и развития бобов на адаксиальной поверхности листьев были обнаружены признаки точечных некрозов, которые в дальнейшем сливались в

сплошные некротизированные участки. Поврежденные листья скручивались, преждевременно усыхали и опадали. Учитывая условия вегетационного опыта (пространственная изоляция корневых систем и побегов, отсутствие насекомых-переносчиков), горизонтальный перенос вирусов от больных растений к здоровым исключен. Вертикальный перенос вирусов в растительном организме, как известно,

происходит посредством дальнего (пассивный транспорт вирионов из пораженных участков с током ассимилянтов по элементам проводящей системы во все ткани растений, включая репродуктивные) и ближнего транспорта (по плазмодесмам — от клетки к клетке) [5]. По характеру мозаики листьев, морфологическим признакам нитевидных вирионов размером 740–760 нм и результатам ПЦР анализа (рис. 1) патоген идентифицирован, как вирус обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ) [7, 8, 15, 19].

По интенсивности флуоресценции продуктов амплификации, можно допустить, что содержание вирусной РНК в тканях листьев и околоплодника несколько выше, нежели в клетках формирующихся семян (рис. 2, б).

Следовательно, в репродуктивных органах фасоли существуют и эффективно действуют тканевые и клеточные барьеры, препятствующие свободному транспорту вирусных частиц с восходящим током макромолекул из инфицированных вегетативных органов.

Для выяснения путей проникновения вирусов в семена *Phaseolus vulgaris* значительный интерес представляет способность цветков к самоопылению, что допускает возможность переноса фитопатогенов пыльцой. Самоопыление у фасоли обыкновенной происходит к моменту раскрытия цветков. По нашим данным цветки инфицированных вирусами растений несколько мельче здоровых. До 20–35 % цветков увядало и опало еще на стадии бутонов. Тем не менее, у больных растений даже на фоне общего снижения показателя реализации репродуктивного потенциала после самоопыления формировались полноценные бобы. Динамика развития плодов у инфицированных растений была несколько замедленной, однако морфологически они мало отличались от здоровых. На плаценте завязи бессимптомных растений закладывалось в среднем до 5–6 семязачатков. У растений, пораженных ВОМФ, количество полноценных семязачатков уменьшалось вдвое, а аберрантных соответственно увеличивалось. При этом следует отметить, что растения, инфицированные ВОМФ, цвели и формировали полноценные бобы. Таким образом, в относительно благоприятных условиях: при постоянной температуре ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) и влажности воздуха ($70 \pm 5\%$), достаточном для ве-

гетации уровне освещения (5–7 кЛк) растение фасоли, инфицированное ВОМФ, способно частично или полностью реализовать репродуктивную функцию.

Жизнеспособность семян, при допустимой вирусной нагрузке, во многом обусловлена структурной организацией семязачатка до и после его опыления. Исследования генеративных органов фасоли показали, что в норме семязачаток у *Phaseolus vulgaris* кампилотропного типа [20], крассинуцеллярный, битегмальный. Внутренний интегумент 3-х слойный (клетки 17–25 мкм), наружный — массивный многослойный, со стороны рафе — 100–120 мкм, антирафе — 45–50 мкм. Микропиле изогнутое или зигзагообразное, образуется обоими интегументами. В микропиллярной области клетки эпидермы наружного интегумента преобразуются в секреторные. Выделяя биологически активные вещества, секреторные клетки стимулируют прорастание пыльцевой трубки и способствуют ее вхождению в пространство микропиллярного канала. Внутренний эпидермис внутреннего интегумента к моменту оплодотворения семязачатка трансформируется в интегументальный тапетум (эндотелий). Его клетки постепенно вытягиваются в радиальном направлении, а цитоплазма становится более зернистой и густой, ядра мелкие — до 7–8 мкм. Клетки подлежащего слоя остаются мелкими таблитчатыми, с несколько удлиненными периклиналильными стенками. Граница между внутренним и наружным интегументами обычно выражена слабо. Фуникулус семязачатка массивный и короткий (140–160 мкм), со слабо выраженным фуникулярным obturatorом, рядом с которым дифференцируется небольшой плацентарный obturator. Нуцеллус грушевидный (в широкой части до 200 мкм), несколько изогнутый в микропиллярной зоне. В его апикальной области образуется нуцеллярный колпачок. Клетки колпачка 7–8 мкм с ядрами, богатыми хроматином. После оплодотворения его клетки сохраняются длительное время и, вероятно, на начальных стадиях развития зародыша выполняют гаусториальную функцию. В базальной области нуцеллуса дифференцируется подиум и постамент. Наружные и внутренние периклиналильные стенки клеток (30–35 мкм) эпидермиса средней

зоны нуцеллуса покрыты толстой кутикулой. До оплодотворения они крупнее клеток халазальной зоны (10–15 мкм), которые после оплодотворения сильно вытягиваются, вакуолизируются и покрываются каллозой (флуоресцирует с анилиновым синим). Клетки базальной области нуцеллуса одревесневают и инкрустируются компонентами М-лигнина. У растений, инфицированных вирусами, процесс отложения на клеточных стенках биополимеров происходит значительно интенсивнее, что подтверждается результатами флуоресцентной микроскопии (рис. 3, а–в).

В основании нуцеллуса и внутреннего интегумента, на границе с халазой, формируется гипостаза. Семязачаток после оплодотворения становится кампилотропным семенем [21]. Наиболее интенсивно разрастаются ткани со стороны рафе. На стадии формирования глобулярного зародыша наружные и внутренние периклиналильные стенки клеток наружной эпидермы образуют толстые слои кутина. Особенно большие его отложения (до 12 мкм на внешних стенках и 4–6 мкм на внутренних) просматриваются в фуникулярной зоне.

Проводящий пучок из плаценты через фуникулус подходит к массивной халазе. Клетки проваскулярного пучка к моменту оплодотворения семязачатка дифференцируются в крупные (до 6–8 мкм в диаметре) трахеиды со спиральными утолщениями. Ниже проводящего пучка в халазальной части выявлена система многоклеточных нечленистых млечников (длина клеток – 60–70 мкм, ширина – 10–12 мкм).

Присутствие в васкулярной системе генеративных органов вирусных частиц индуцирует специфические преобразования паренхимы (инкрустация оболочек клеток лигнином), прилегающей к проводящим тканям (рис. 4, в–г). Тот факт, что интенсивное отложение конституционных веществ обнаруживалось в живых тканях структурных элементов семязачатков вдоль основных потоков транспорта питательных веществ, определяет высокую чувствительность растений к патогенам и выявляет наиболее вероятные пути проникновения вирусов в ткани зародыша, семени и плода.

Учитывая, что проводящие пучки пронизывают ткани наружного интегумента, вирусные

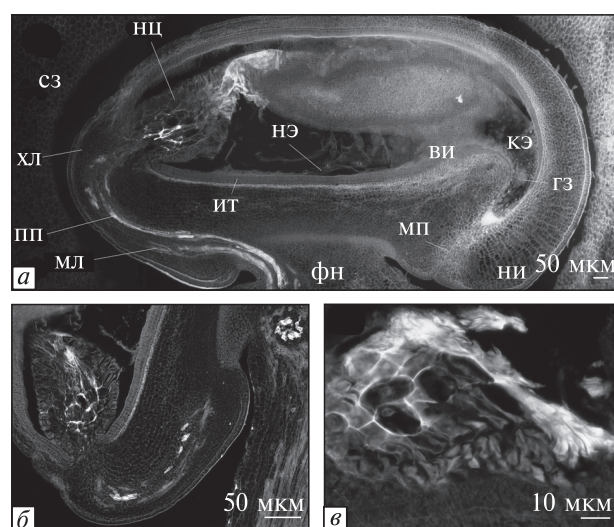


Рис. 3. Флуоресценция клеток и тканей семязачатка *Phaseolus vulgaris* (продольный латеральный разрез): а – общий вид семязачатка: нц – нуцеллус, нэ – нуклеарный эндосперм; сз – стенка завязи; пп – проводящий пучок; тр – трахеиды; фн – фуникулус; пр – паренхима; гз – глобулярный зародыш; ит – интегументальный тапетум; ви – внутренний интегумент; ни – наружный интегумент; мл – млечники; хл – халаза; кэ – клеточный эндосперм; мп – микропиле. б, в – отложение лигнина в нуцеллярном барьере; окрашивание корифосфином (1 : 1000)

частицы могут беспрепятственно проникать в апикальную зону семени, где находится зародыш. При высокой концентрации вирусные частицы преодолевают внутренние тканевые барьеры формирующихся семян и долго сохраняются в тканях семени, вызывая реакции сверхчувствительности, которые завершаются деградацией тканей репродуктивных органов. В перикарпии инфицированных растений обнаруживалось увеличение общего количества соединений, наполненных полифенольными соединениями. По интенсивности накопления в тканях инфицированных семязачатков фасоли продуктов вторичного метаболизма в нуцеллусе выделяется несколько зон (рис. 4, а–б, показано стрелками): халазальная, базальная и микропиллярная. Значительная лигнификация и суберинизация клеточных стенок наиболее выражена у поврежденных семязачатков. В таких условиях симпластный транспорт макромолекул и транслокация вирусных частиц из клеток прилежащих соматических тканей существенно затрудняется.

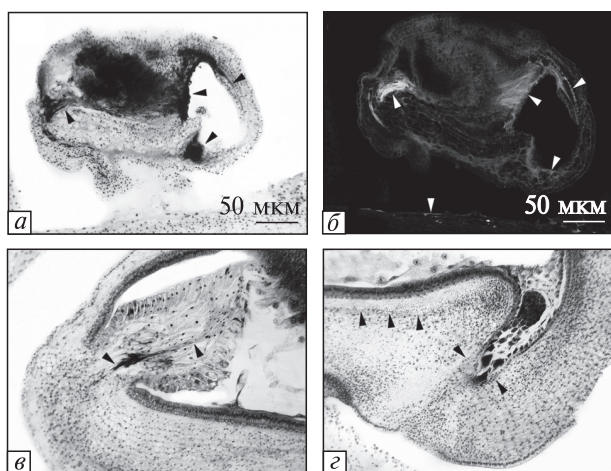


Рис. 4. Отложения лигнина и каллозы в тканях семязачатка *Phaseolus vulgaris* (продольный латеральный разрез): *a–b* – вирус индуцированная деградация семязачатка с проявлением реакции сверхчувствительности (стрелками показаны ткани со значительными отложениями фенольных веществ, лигнина (*a* – окрашивание гематоксилином) и каллозы (*b* – окрашивание анилиновым синим (1 : 1000)); *v* – отложение лигнина в проводящей зоне нуцеллуса; *z* – отложения лигнина в микропиларной зоне семязачатка и внутренней части наружного интегумента (показано стрелками)

Важным диагностическим признаком присутствия в растениях ВОМФ является образование в живых клетках особых включений – нуклеопротеидных комплексов. Вирусные включения представляют собой изометрические кристаллы 0,4–0,8 мкм в поперечнике и овальные зернистые тельца размером 2–6 мкм, которые демонстрируют характерные химические реакции на белок [18]. При исследовании инфицированных семязачатков *Phaseolus vulgaris* методом флуоресцентной микроскопии в структуре ядер и цитоплазмы клеток наружной эпидермы и среднего слоя внутреннего интегумента нам удалось выявить характерные для ВОМФ овальные зернистые включения (рис. 5).

Обработка тканей семязачатка горячей (90 °С) трихлуксусной кислотой позволила полностью погасить свечение нуклеиновых кислот в ядрах и ядрышках и значительно усилить свечение белковых включений (рис. 5, *a*). В отдельных клетках зернистые включения вирусов образовывали небольшие агрегации размером – 2,8–

3,0 мкм. В эндотелии они встречались значительно реже (рис. 5, *в*). В клетках нуцеллуса и эндосперма вирусных включений не обнаружено (рис. 5, *a, в*). Наибольшее количество клеток (до 20–27 %) с вирусными включениями было выявлено в зародыше и суспензоре (рис. 5, *б, z*). В клетках нуцеллуса апикальной зоны семязачатка, окружающих зародыш, выявлено активное свечение протопласта без специфических включений, что может быть связано с формированием микропиларного барьера, препятствующего переносу вирусных частиц.

Особенности свечения клеточных стенок в тканях семязачатка подтверждают их пространственную гетерогенность. Так интенсивность флуоресценции наружных стенок в клетках интегументального тапетума была в 2,0 раза выше, чем тангентальных стенок (рис. 6, *a*).

При этом интенсивность свечения биополимеров в наружных и тангентальных стенках эпидермы нуцеллуса существенно не отличалась (рис. 6, *z*). Яркая флуоресценция была характерна для клеток, задействованных в транспорте метаболитов от гипостазы через постаменто-подиум в зародышевый мешок. В лигнифицированных участках тканей клеточные стенки флуоресцировали в 2,5 раза интенсивнее, чем наружные клеточные стенки (рис. 6, *б*). Это подтверждает накопление в них биополимеров, в том числе фенольной природы, которые создают тканевой барьер и препятствуют транслокации вирусных частиц в клетки эндосперма и далее к зародышу. На фоне цитоплазмы наиболее интенсивным было свечение вирусных включений. После окрашивания акридиновым оранжевым их флуоресценция, по сравнению с содержимым ядерного аппарата, была ярче в 2,3–2,4 раза. Это позволяло их четко идентифицировать (рис. 6, *в*).

Известно, что полипротеины в ядрах представлены малыми (N1a) и большими (N1b) ядерными включениями [22, 23]. Их интенсивное накопление в ядрах зародыша может свидетельствовать о снижении активности соответствующих протеиназ. Напротив, в клетках интегументального тапетума включения обнаруживались в протопластах клеток интегументов. В соответствии с современными представлениями в цитоплазме локализуются аморфные (AI) и цилиндрические (CI) вирус-

ные включения. Считается, что последние обладают способностью регулировать просвет плазмодесмовых каналов, и ответственны за транслокацию потивирусов от клетки к клетке [24]. Однако, ткани семячатка фасоли организованы таким образом, что перенос вирусов и других фитопатогенов по симпласту из одной ткани в другую затруднен. Это связано с особенностями расположения и состоянием плазмодесмовых каналов, а также значительными отложениями биополимеров на границе прилежащих тканей.

У восприимчивых сортов передача вирусов от материнского растения к зародышу может происходить в микропиллярной зоне при контакте клеток суспензора с клетками эндотелия на начальных стадиях развития [25]. При этом допускается, что даже незначительного количества вирусных частиц достаточно для их проникновения в основание суспензора до начала его дегенерации [26]. В крассинуцеллярных семячатках основной путь транспорта веществ проходит базально по хорошо дифференцированной проводящей системе через гипостазу в халазальную зону нуцеллуса, и далее по апопласту через клетки антипод в эндосперм и зародыш [21].

Проникновение вирусных частиц в генеративную клетку на стадии мегаспорогенеза может блокироваться отложениями каллозы [21]. На стадии развития зародышевого мешка метаболиты накапливаются в соматических клетках семячатка. Стенка зародышевого мешка представляет собой целостную структуру, которая функционирует, как единый апопласт [27]. Она проницаема исключительно для низкомолекулярных веществ и ионов, что препятствует проникновению вирусного генома и вирионов непосредственно в зародышевый мешок.

Таким образом, циркуляция вирусов в семячатке и развивающемся семени *Phaseolus vulgaris* происходит, главным образом, по базальному пути через проводящий пучок из околоплодника в халазальную область семячатка и оттуда через гипостазу в нуцеллус (рис. 7). Далее вирусные частицы способны перемещаться в ткани наружного и внутреннего интегумента (с ограничением в ткани интегументального тапетума, где вирусные включения встречаются крайне редко).

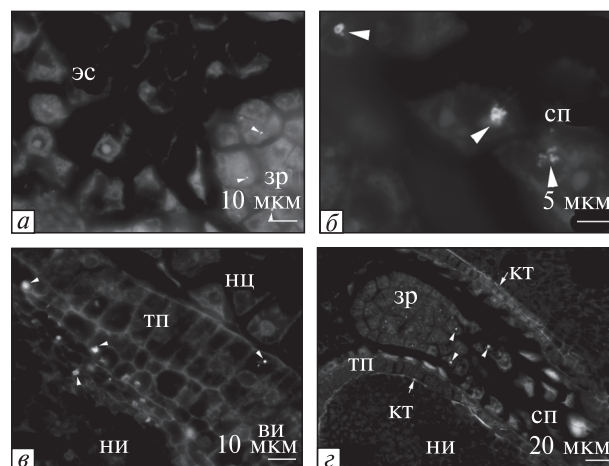


Рис. 5. Вирусные включения в тканях зародыша и семячатков *Phaseolus vulgaris*: а — локализация ядерных вирусных включений в зародыше и их отсутствие в эндосперме; б — диффузные вирусные включения в клетках суспензора; в — вирусные включения в наружных слоях клеток внутреннего интегумента; з — образование кутикулы и локализация вирусных включений в базальной части зародыша; тп — интегументальный тапетум, кт — отложения кутина на внешних и внутренних периклиниальных стенках эндотелия; ни — наружный интегумент; ви — внутренний интегумент, нц — нуцеллус; зр — зародыш; эс — эндосперм; сп — суспензор; стрелками показаны вирусные включения. Окрашивание акридиновым оранжевым (1 : 10 000)

Данный путь транслокации вирусов от материнского растения к зародышу на стадии проэмбрио представляется нам наиболее вероятным. Кроме того, значительная концентрация вирусных включений в клетках зародыша может свидетельствовать о вероятности его заражения ВОМФ в результате переноса инфицированной пылью [28, 29], что является одним из способов преодоления вирусами тканевых барьеров семячатка.

В заключении следует отметить, что системная вирусная инфекция влияет на регуляцию активности генов в растении. Изменения активности транскрипции и трансляции зависят от сорта растения, от штамма вируса и скорости его рекомбинации, в частности в процессе генетического обмена между различными вирусами в инфицированной клетке-хозяине [13, 25, 30]. В свою очередь и вирусные патогены способны повышать гомологичную ре-

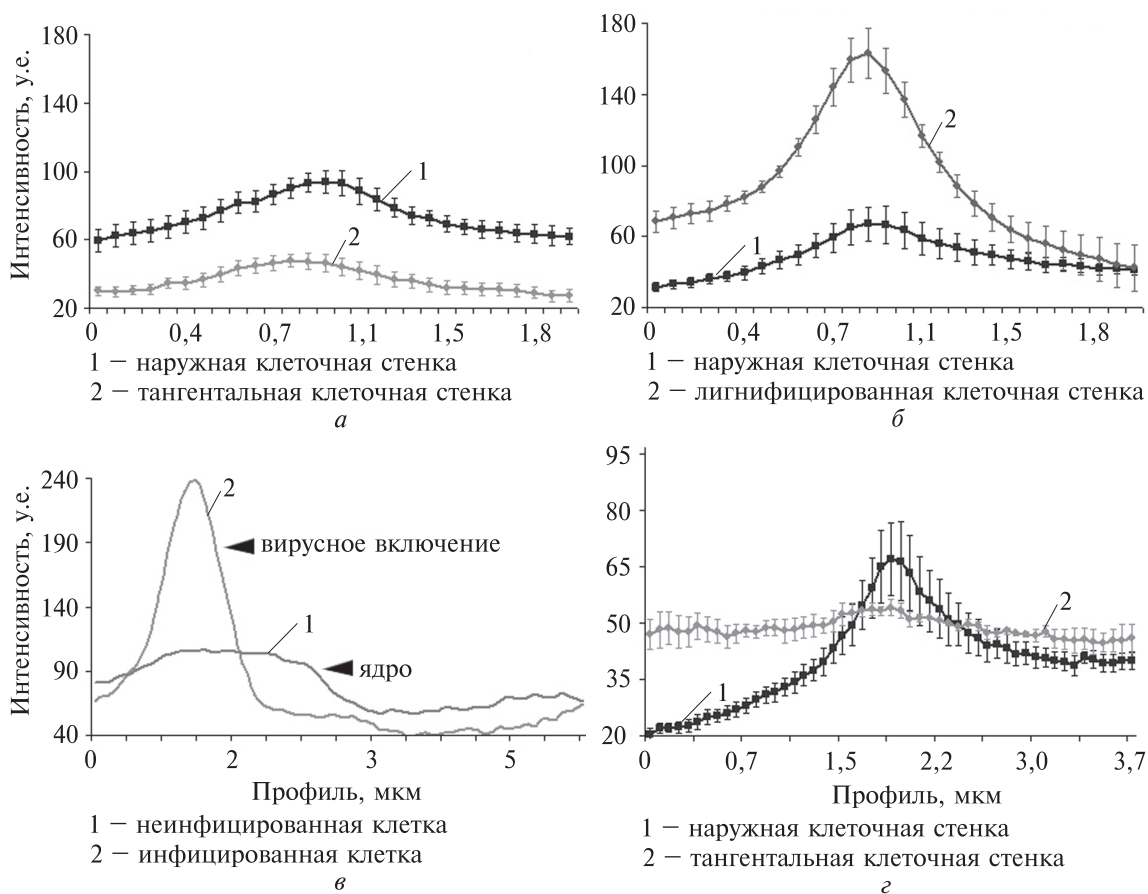


Рис. 6. Флуоресценция клеточных стенок и внутриклеточных структур в семязачатке *Phaseolus vulgaris*: а – наружные и внутренние клеточные стенки интегументального тапетума; б – инфицированная клетка с вирусным включением и здоровая клетка зародыша; в – отложение лигнина в нуцеллярном барьере; г – наружные и тангентальные клеточные стенки нуцеллуса; окрашивание корифосфином (1 : 1000)

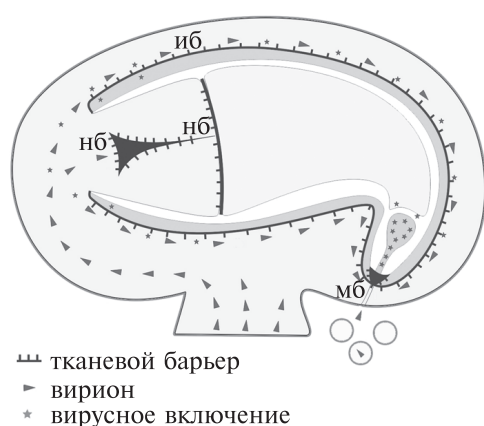


Рис. 7. Ограничение транспорта вирусов тканевыми барьерами семязачатка *Phaseolus vulgaris*: нб – нуцеллярный барьер; иб – интегументальный барьер; мб – микропиларный барьер

комбинацию у инфицированных растений долго до проникновения в клетки, что объясняется наличием у высших растений эффективной системы рекомбинационного сигналинга [31]. Таким образом, передача вирусов семенами у инфицированных растений происходит на фоне комплекса защитных реакций, которые могут существенно повлиять на способы транслокации вирусов, их реплекативную активность и стабильность.

Выводы. В условиях некритичной вирусной нагрузки растения *Phaseolus vulgaris* успешно опыляются и образуют полноценные плоды и семена, часть из которых инфицирована вирусами обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ). Установлено, что у растений *Phaseolus vulgaris*, инфицированных ВОМФ, развитие репродук-

тивных органов зависит от концентрации вирусных частиц в соматических тканях: при низкой нагрузке — формируются тканевые барьеры, препятствующие транспорту вирусов; при высокой — развивается типичная реакция сверхчувствительности, вызывающая деградацию семязачатков. В инфицированных ВОМФ семязачатках *Phaseolus vulgaris* в ядрах и цитоплазме клеток наружной эпидермы, а также в среднем слое внутреннего интегумента, выявлены характерные для ВОМФ овальные зернистые вирусные включения. Наибольшее количество включений (от 20 до 27 %) находилось в клетках зародыша и суспензора. При этом в эндотелии нуклеопротеиновые включения встречались значительно реже, а в клетках нуцеллуса и эндосперма они не обнаружены. Показано, что транслокация вирусных частиц в семязачатках *Phaseolus vulgaris* может происходить: дальне-дистантным путем по развитой васкулярной системе из плаценты инфицированного растения через фуникулус к халазальной зоне, где дальнейшее передвижение вирусов через клетки гипостазы и подиума блокируется нуцеллярным барьером; коротко-дистантным — по симпласту из клетки в клетку (блокируется микропилярным и интегументальным барьерами) а также в процессе само- или перекрестного опыления цветков инфицированной пылью.

Соответствие этическим стандартам. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием организмов или органов людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Это исследование не получало финансирования от учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

FORMATION OF CELL AND TISSUE BARRIERS OVULES *PHASEOLUS VULGARIS* L. IN A SYSTEM OF ANTIVIRAL RESISTANCE

A.F. Likhanov, I.A. Antipov,
K.V. Hrynychuk, I.V. Dragovoz

Institute for evolutionary ecology NAS Ukraine
The National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine
D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS Ukraine

E-mail: igordragovoz@ukr.net

The formation of bean seeds in plants systemically infected with common bean mosaic virus is accompanied by the intense deposition of callose and lignin in nucellar, integumental, mikopillary areas as well as in tissue barriers thus preventing the spread of viruses. The tissue degradation of ovules with the development of the typical hypersensitivity reaction occurs in case of high virus particles concentration in plants. The diffuse granular viral inclusions were detected in the cytoplasm and nucleus of developing embryo cells. Ways of virus transport were determined by structural features of the vascular system or the ovule tissues and localization of viral inclusions in the tissues during seed formation.

ФОРМУВАННЯ КЛІТИННИХ ТА ТКАНИННИХ БАР'ЄРІВ НАСІННЄВОГО ЗАЧАТКА *PHASEOLUS VULGARIS* L. В СИСТЕМІ ПРОТИВІРУСНОЇ СТІЙКОСТІ

Ліханов А.Ф., Антіпов І.А.,
Грінчук О.В., Драговоз І.В.

Формування насіння за системного зараження рослин вірусами звичайної мозаїки квасолі супроводжується інтенсивним відкладанням калози і лігніну в зонах нуцелярного, інтегументального і мікропілярного тканинних бар'єрів, що перешкоджають проникненню вірусів. За високої концентрації вірусних частинок відбувається деградація тканин насінневих зачатків з проявленням типової реакції надчутливості рослин. В цитоплазмі і ядрах клітин зародків, що розвиваються, виявлені дифузні зернисті вірусні включення. За особливостями будови васкулярної системи і тканин насінневих зачатків, а також локалізації вірусних включень в тканинах насіння, що формується, встановлені ймовірні шляхи транспорту вірусів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Hull R. *Matthews' plant virology*, 4th ed. Academic Press, San Diego, 2001, pp. 546–81.
- Moskovets, S.M., Kraiev, V.H., Porembaska, N.B., Bilyk, L.H., and Baratova, D.F., *Virusy i virusni khvoroby bobovykh kultur na Ukraini*. K.: Nauk. dumka, 1971, 150 p. (in Russian).
- Mishchenko, L.T., Dunich, A.A., and Shcherbatenko, I.S., Phylogenetic analysis of Ukrainian seed-transmitted isolate of Soybean mosaic virus, *Biopol. Cell*, 2018, vol. 34, no. 3, pp. 229–38. doi: 10.7124/bc.00097D.
- Shevchenko, Zh.P., *Virusni ta mikoplazmovi khvoroby polovykh kultur*, K.: Urozhai, 1995, 300 p.
- Kiraly, L., Barna, B., and Kiraly, Z., Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance, *Phytopathol.*, 2007, vol. 155, pp. 385–96. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01264.x.

6. Kehler Kh., Kliinkhempel Kh., Mertel K. y dr., Borba s vyirusnymi bolezniamy rastenyi, Moscow: Ahropromyzdat, 1986, 479 p. (in Russian).
7. Kyrychenko, A.M., Kovalenko, O.H., Zvychaina mozaika kvasoli na Kyivshchyni: etiologhiia khvoroby ta identyfikatsiia zbudnyka, Mikrobiol. zhurnal, 2018, vol. 80, no. 4, pp. 96–107 (in Ukrainian). doi:10.15407/microbiolj80.04.096.
8. Mysil, M., Kvicala, B.A., and Leskova, O., Diagnostika vyusov strukovin a datelinovin, Bratislava: VEDA vydavatelstvo Slovenskej akademie vied, 1981, 180 p.
9. Agrios G. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, 2005, pp. 723–824.
10. Atabekov, J.G., Dorokhov, Y.L., Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses, *Adv. Virus Res.*, 1984, vol. 29, pp. 313–64. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60412-1.
11. Dodds, J.A., Hamilton, R.I., Structural interactions between viruses as a consequence of mixed infections, *Adv. Virus Res.*, 1976, vol. 20, pp. 33–86. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60501-1.
12. Boiko, A.L., Silaeva, A.M., Mishchenko, L.T., and Reshetnik, G.V., Peculiarities of ultrastructural organization of the winter wheat mesophyll cells under conditions of virus infection, *Cytol. Genet.*, 1997, vol. 31, no. 5, pp. 71–8 (in Ukrainian).
13. Martin, K., Singh, J., Hill, J.H., Whitham, S.A., and Cannon, S.B., Dynamic transcriptome profiling of Bean Common Mosaic Virus (BCMV) infection in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *BMC Genom.*, 2016, vol. 17, no. 613, pp. 1–19. doi:10.1186/s12864-016-2976-8.
14. Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J., Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, pp. 495–503. PMID: PMC269651.
15. Antipov, I.O., Hrynchuk, K.V., and Duplyak, O.T., Rozrobka PLR-system dlia identyfikatsii virusu zvychainoi mozaiky kvasoli (Bean common mosaic virus), *Nauk. visnik Natsional. un-tu biores. prirodokorist. Ukrayiny*, 2016, vol. 234, pp. 40–6 (in Ukrainian).
16. Pausheva, Z.P., *Praktykum po tsytolohyy rastenyi*, M.: Ahropromyzdat, 1988, 271 p.
17. Furst, H.H., *Metodi anatomo-hystokhymycheskoho yssledovanyia rastytelnikh tkanei*, Moscow: Nauka, 1979, pp. 40–65 (in Russian).
18. Holdyn, M.Y., *Vyrusnie vkluchenyie v rastytelnoi kletke y pryroda vyusov*, Moscow: Yzd-vo AN SSSR, 1963, 204 p (in Russian).
19. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., and Ball, L.A., *Virus Taxonomy*, San Diego, USA, Academic Press., 2005, p. 1162.
20. Takhtadzhiana, A.L., *Sravnitelnaia anatomyia semian*, SPb, Nauka, 1992, pp. 374–6.
21. Shamrov, Y.Y., *Semiazachatok tsvetkovikh rastenyi: stroenye, funktsyy, proyskhozhdenye*, Moscow: Tov-vo nauch. yzd. KMK, 2008, 350 p. (in Russian).
22. Revers, F., Gall O., Candresse, T., and Maule, A.J., New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, vol. 12, no. 5, pp. 367–76. doi:10.1094/mpmi.1999.12.5.367.
23. Flores-Estevez, N., Acosta-Gallegos, J.A., and Silva-Rosales, L., Bean common mosaic virus and Bean common mosaic necrosis virus in Mexico, *Plant Disease*, 2003, vol. 87, no. 1, pp. 21–5. doi:10.1094/pdis.2003.87.1.21.
24. Lee, J.Y., Lucas, W.J., Phosphorylation of viral movement proteins: regulation of cell-to-cell trafficking, *Trends Microbiol.*, 2001, vol. 9, pp. 5–8. doi:10.1016/s0966-842x(00)01901-6.
25. Jossey, S., Hobbs, H.A., and Domier, L.L., Role of soybean mosaic virus-encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean, *Phytopathol.*, 2013, vol. 103, pp. 941–8. doi:10.1094/phyto-09-12-0248-r.
26. Folsom, M.W., Cass, D.D., Changes in transfer cell distribution in the ovule of soybean after fertilization, *Canad. J. Bot.*, vol. 64, no. 5. pp. 965–72. doi: 10.1139/b86-130.
27. Roberts, I.M., Wang, D., Thomas, C.L., and Maule, A.J., Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance, *Protoplasma*, 2003, vol. 222, pp. 31–43. doi:10.1007/s00709-003-0015-5.
28. Card, S.D., Pearson, M.N., and Clover, G.R.G., Plant pathogens transmitted by pollen, *Australasian Plant Pathology*, 2007, vol. 36, no. 5, pp. 455–61. doi: 10.1071/ap07050.
29. Bennett, C.W., Seed transmission of plant viruses, *Adv. Virus Res.*, 1969, vol. 14, pp. 221–61. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60561-8.
30. Froissart, R., Roze, D., Uzest, M., Galibert, L., Blanc, S., and Michalakakis, Y., Recombination every day: abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection, *PLoS Biol.*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 389–95. doi:10.1371/journal.pbio.0030089.
31. Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., Kalck, V., Boyko, V., Filkowski, J., Heinlein, M., and Hohn, B., Pathogen-induced systemic plant signal triggers DNA rearrangements, *Nature*, 2003, vol. 423, no. 6941, pp. 760–62. doi: 10.1038/nature01683.

Поступила в редакцию 12.07.19
 После доработки 14.08.19
 Принята к публикации 18.03.20