

vesicular stomatitis virus. The *Althaea officinalis* is a most suitable plant species for obtaining transgenic plant with high antiviral activity.

**Key words:** *Agrobacterium rhizogenes*, transformation, *Lactuca sativa* L., *Althaea officinalis* L., *Cichorium intybus* L.

**МЕЛЬНИЧУК М.Д., КОЛОМІЄЦЬ Ю.В., ЛІХАНОВ А.Ф., АВETИСЯН Ю.Ф.**

Національний університет біоресурсів і природокористування України  
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, e-mail: julyja@i.ua

## СПЕЦИФІЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ ТОМАТІВ (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) ПІД ВПЛИВОМ ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Томати – одна з популярних і основних культур овочівництва. Плоди томатів піддаються бактеріальним хворобам, що суттєво знижує врожайність культури і якість продукції. Для визначення надійних ознак стійкості рослин до фітопатогенних чинників та отримання високопродуктивних і несприйнятливих до збудників хвороб сортів томатів регулярно проводяться цитологічні та гістологічні дослідження патогену,

які уможливають виявлення специфічних морфо-фізіологічних маркерних ознак конституціональної стійкості рослин, а також дозволяють визначити специфіку взаємодії організмів у системі рослина – патоген. У зв'язку з цим метою наших досліджень було вивчення трансформації тканин і клітин репродуктивних органів томатів (*Lycopersicon esculentum* Mill.) в умовах бактеріозів.

### Матеріали і методи

Для досліджень специфіки трансформації тканин репродуктивних органів томатів нами були обрані сорти «Стожар», «Лагідний», «Настенька», «Санька», «Ефемер», «Новичок». Структурно-функціональну перебудову у насінневих зачатках і плодах вивчали методами світлової та люмінесцентної мікроскопії. Анатомо-гістологічні дослідження тканин проводили за стандартними протоколами [2] з використанням мікроскопа AxioScore A-1 Carl Zeiss. Анатомо-гістохімічні дослідження квіток і плодів проводили на постійних мікропрепаратах товщиною 10-12 мкм. Рослинний матеріал фіксували розчином Чемберлена [1]. Зразки зневоднювали

і просочували парафіном. Зрізи виготовляли на санному мікромі. Тканини фарбували ацетофуксином, сафраніном – водним синім, гематоксилином за Гейденгайном, корифосфіном, флуоресцеїном (розведення 1 : 10000). Лінійні показники анатомічних структур вимірювали у спеціалізованій комп'ютерній програмі Axio Vision Rel. 4.7. Морфометричні показники тканин визначали у 10-ти кратній повторності, діаметр клітин, структурні елементи генеративних органів - у 30-ти кратній. Отриманні результати обробляли статистично з використанням програм Microsoft Office Excel та STATISTICA 6.

### Результати та обговорення

З'ясовано, що в обраних нами сортах томатів навіть після застосування хімічних засобів боротьби з фітопатогенними мікроорганізмами, виявлялися симптоми бактеріальних захворювань. Рослини томатів, які уражені патогенами мають ознаки структурної перебудови мезофілу листків, мікроспорангіїв, плаценти та насінневих зачатків на тканинному і клітинному рівні. Первісною захисною реакцією рослин на шкодочинну дію фітопатогенних мікроорганізмів є процес опробковіння, посиленої кутинізації та суберінізації клітинних стінок епідермісу та мезофілу листків, паренхіми квіток і плодів. Бактеріальні інфекції томатів викликають порушення мікро-

спорогенезу, що призводить до зменшення загальної кількості фертильного пилку і орбікул, до складу яких входить спорополенін; викликають аберації насінневих зачатків за трьома типами.

Встановлено, що бактеріальний патогенез призводить до повного руйнування хлоропластів і ядер клітин. Під впливом екзометаболітів бактерій у клітинах мезокарпію утворюється в'язкий за консистенцією секрет полісахаридної природи (позитивна реакція ШИК), який викликає значні функціональні порушення протопластів, індукує створення додаткових клітинних перетинок, викликає хлорози з подальшою некротизацією тканин (рис. 1, а,б).

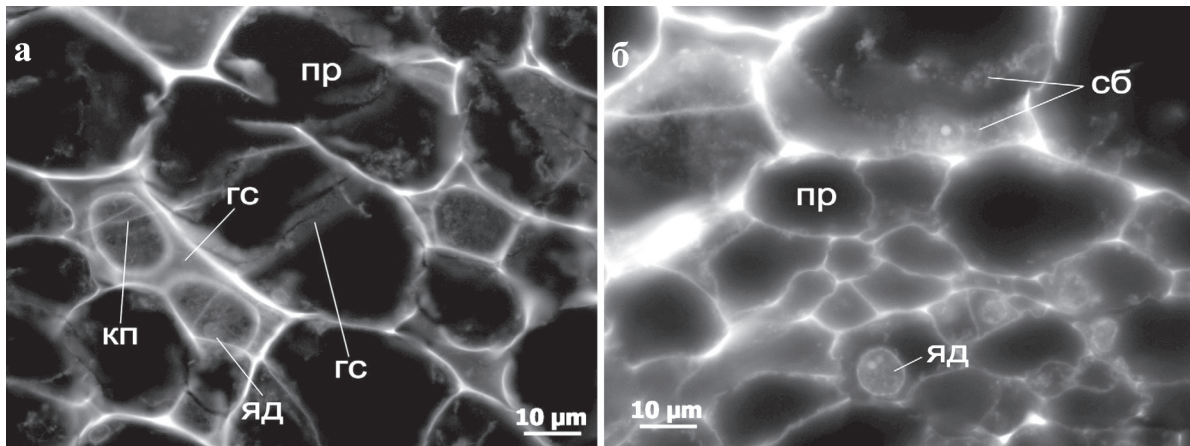


Рис. 1. Особливості аномальної трансформації тканин плаценти (а) і мезокарпію (б) в недозрілих плодах томатів з ознаками бактеріозу: пр – паренхіма плаценти; кп – макрофіброзні потовщення, що утворюють клітинні перегородки; гс – гелеподібна структура бактеріального походження (акридино-вий оранж. 1 : 10000, фільтр Yellow); сб – виділення бактерій; яд – ядро

На поперечному розрізі провідні пучки в ягодах томатів сорту «Стожар» формуються групами по 2–3. Їх діаметр становить 150–170 мкм. У центрі розташовуються трахеїди, по периферії клітини флоєми: ситовидні трубки та супутникові клітини. Поширення бактеріальних клітин по тканинах відбувається латерально від провідних пучків, і, як правило, рівномірно.

У мікроспорангіях уражених патогенними бактеріями рослин томатів були відсутні орбікули – особливі сфероїдальні структурні компоненти пиляків розміром 0,43–0,46 мкм. У нормі вони утворюються в цитоплазмі клітин тапетуму з про-орбікул на стадії дозрівання мікроспор. Орбікули локалізовані на внутрішніх та зовнішніх тангентальних і радіальних стінках тапетуму (рис. 2, а). Ймовірно, що формуванням цих специфічних структур генетично пов'язано з порушенням мікроспорогенезу під впливом патогенних мікроорганізмів. До складу оболонки орбікул входить спорополенін – гідрофобна хімічно стійка речовина, яка необхідна для утворення оболонки фертильного пилку. За нашим даними гістохімічних досліджень, з усіх мікроспор, що виявлялися у гніздах пиляків, лише 50–55% є фертильними (рис. 2, б). Для повноцінного пилку характерна густа цитоплазма, наявність цілком сформованого вегетативного ядра й генеративної клітини. Флуоресценція спорополенінової оболонки пилку у нормально сформованого пилку яскравіша ніж у стерильного.

У патогенезі тканини насінневих зачатків трансформуються. При вивченні структури пло-

дів томатів з ознаками бактеріальних захворювань було встановлено, що окрім нормально сформованих, але не запліднених насінневих зачатків, у тканинах плаценти утворюється велика кількість аберантних, які за комплексом ознак-маркерів можна розділити на три типи: 1 тип – зміна морфологічного типу й співвідношення розмірів елементів насінневого зачатка; 2 тип – зміна динаміки розвитку (передчасна дегенерація структур); 3 тип – відсутність структур або утворення додаткових.

У досліджених нами плодах, зустрічалися аберантні насінневі зачатки всіх трьох типів. Ступінь вираженості патогенної трансформації генеративних органів залежить від багатьох умов. По-перше, природа захворювання рослини, фітопатогенні властивості мікроорганізмів, швидкість їх розмноження, характер впливу екзометаболітів на пластичний обмін тканин насінневих зачатків, здатність до подолання внутрішніх клітинних бар'єрів, стійкість самої рослини до патогенів, швидкість протікання реакції надчутливості рослинного організму. По-друге, від тривалості патогенезу, стадії загального ураження рослини. По-третє, погодні та мікрокліматичні умови місцезростання рослин, пора року, характер мінерального живлення рослини, дефіцит або навпаки надлишок макро- та мікроелементів. Усі ці фактори в значній мірі можуть впливати на характер та швидкість протікання патогенних процесів – від початкових проявів до повної некротизації тканин і загибелі всього організму.

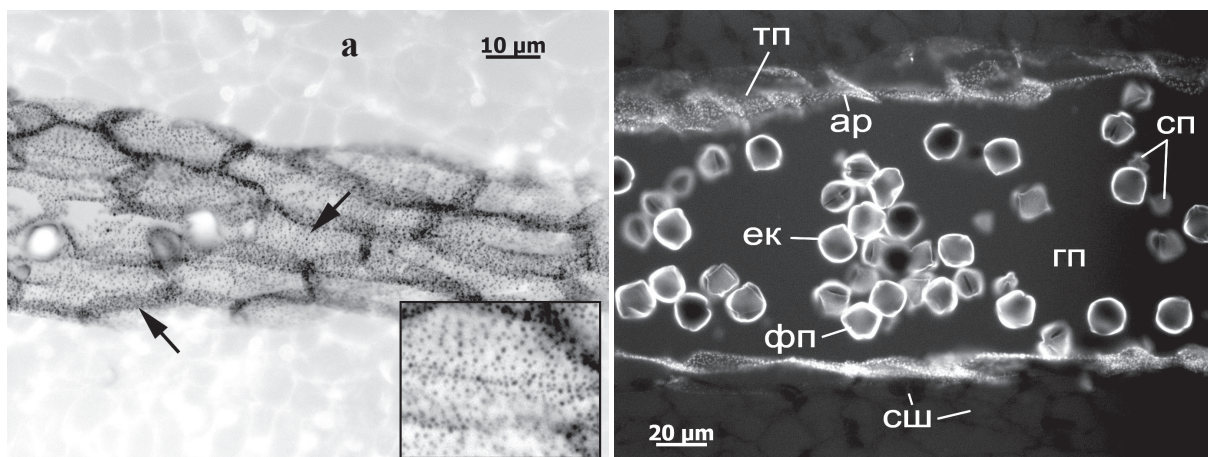


Рис 2. Флуоресценція пилку і орбікул на тангентальних стінках тапетуму в мікроспорангіях неуражених квіток томатів: а – інвертований знімок (стрілками позначені орбікули, або тільця Убіша); б – флуоресценція; гп – гніздо пиляка; тп – тапетум; ар – орбікули; сш – середній шар мікроспорангія; фп – фертильний пилок; сп – стерильний пилок; ек – екзина пилкового зерна

З'ясовано, що у тих випадках коли патогенні мікроорганізми потрапили в плаценту через провідні пучки до закладення основних структурних елементів насінневих зачатків, то структурні порушення в них майже не визначаються. Окрім того, такі насінневі зачатки є здатними до нормального розвинення, у тому числі з утворенням повноцінного насіння. У більшості випадків, як правило, в клітинах починають накопичуватись фенольні сполуки, клітинні стінки пробковіють і стають більш здерев'янілими. Якщо патогенний вплив розпочався ще на ранніх стадіях розвитку насінневого зачатку, то спостерігається перетворення і недорозвинення основних тканини – інтегумента, нуцелуса і зародкового мішка (рис. 3). Тканини фунікулуса,

зазвичай, мають ознаки протікання реакції надчутливості – клітинні стінки стають сильно здерев'янілими з високим вмістом фенольних сполук.

Клітини внутрішніх прошарків інтегумента сильно лігніфікуються, що дозволяє частково, або повністю ізолювати нуцелус і зародковий мішок від шкодочинної дії фітопатогенів. Патогенні мікроорганізми в тканини насінневих зачатків можуть проникнути лише через фунікулус та провідні пучки. Люмінесцентна мікроскопія дозволила встановити, що накопичення патогенних мікроорганізмів, особливо в базальній частині насінневого зачатка, супроводжується значним збільшенням густини протопластів клітин.

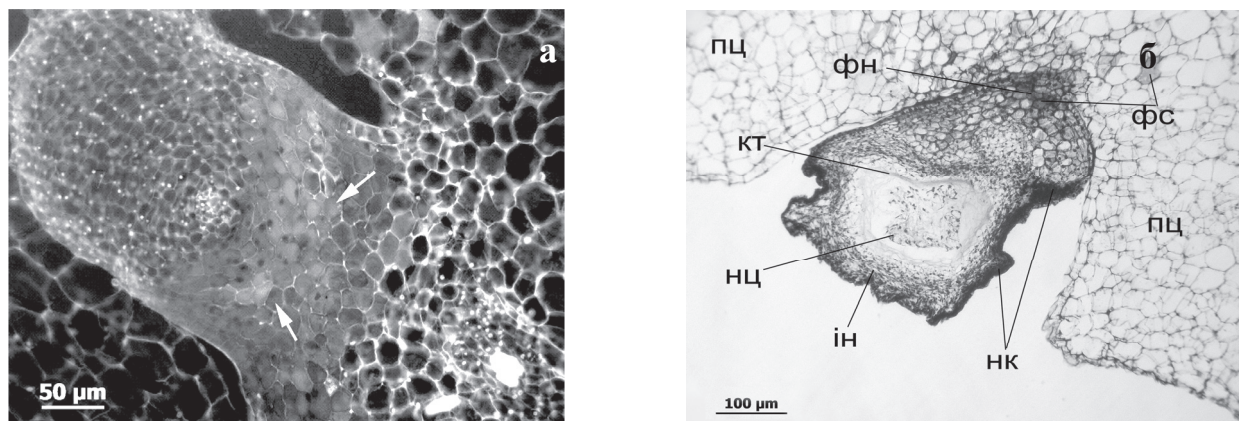


Рис. 3. Трансформація тканин насінневих зачатків *Lycopersicon esculentum* Mill. уражених бактеріями: а – флуоресценція протопластів (показано стрілками) тканин халазальної зони (акридиновий оранж. 1:10000, фільтр Yellow); б – абортні насінневі зачатки з некротичними перетвореннями у плодах томатів із симптомами бактеріозу: пц – плацента; фн – фунікулус; фс – фенольні сполуки; ін – облітеровані клітини інтегумента; нц – нуцелус; кт – кутикула

Клітинні оболонки навколо осередків активного патогенезу сильно флуоресціюють, що більш за все є проявом захисної реакції рослинного організму, у той же час клітини, що мають в протопластах густий секрет, вірогідно полісахаридної природи, навпаки майже не дають світіння.

Зниження флуоресценції клітинних стінок більш за все пов'язано з деструктивними процесами у самих клітинних оболонках. Окрім того, в уражених клітинах ядра піддаються повній деструкції, що призводить до швидкої загибелі клітин і тканин. Топічна спрямованість патогенезу чітко визначається характером розташування та організації васкулярної системи. Патогенез за ознаками ступеня ураженості клітин чітко вказує на те, що патогенні мікроорганізми по тканинам і органам рослини рухаються головним чином по трахеїдах.

У результаті проведених досліджень ми дійшли до висновку, що патогенну некротизацію клітин у тканинах квіток та плодів томатів можна поділити на 6 основних стадій (рис. 4):

1. Активізація метаболізму клітини, що спрямована на підвищення її захисних функцій

(неспецифічного імунітету).

2. Перші конституціональні зміни клітин – потовщення клітинної оболонки завдяки відкладенням лігніну (доведено гістохімічною реакцією на М-лігнін) та підвищений вміст у цитоплазмі фенольних сполук.

3. Утворення оптично гетерогенних структур у протопласті клітини, що розмежовує її на дві суттєво різні частини – здорову та уражену: перша характеризується наявністю ядра, типової для паренхіми цитоплазми з високим вмістом фенольних сполук; друга – оптично щільною цитоплазмою та включеннями, які локалізуються по межі розділу клітини.

4. Помітні конституційні перебудови клітин. Формування нових клітинних перетинок, які розділяють клітину на рівні або нерівні, функціональні та уражені частини.

5. Інтенсивні конституційні перебудови. Значне потовщення клітинних стінок, руйнування ядра, подальший процес сегментації клітини перетинками, часткова некротизація сегментів.

6. Повна некротизація клітин і тканин (як правило відбувається на фоні часткової або повної некротизації суміжних клітин).

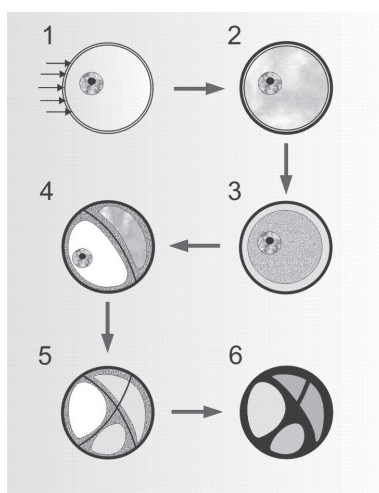


Рис. 4. Послідовні стадії патогенної трансформації клітини паренхіми мезокарпію томатів

### Висновки

Нами запропоновано виділяти 6 основних стадій трансформації тканин репродуктивних

органів томатів за впливу патогенних мікроорганізмів.

### Література

1. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
2. Фурст Г.Г. Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей. – М.: Наука, 1979. – С. 40-65.

MELNYCHUK M.D., KOLOMIETS J.V., LIKHANOV A.F., AVETYSJAN J.F.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine

Ukraine, 03401, Kyiv, 15 Geroiv Oborony St., e-mail: julyja@i.ua

## SPECIFIC TRANSFORMATIONS OF TISSUE REPRODUCTIVE ORGANS OF TOMATOES (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) UNDER THE INFLUENCE PATHOGENIC MICROORGANISMS

**Aims.** The aim of our research was the study of transformation of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in conditions of bakteriozsis. **Methods.** For research we have chosen such kinds of tomatoes as “Zarnica”, “Myaghkaya”, “Nasten’ka”, “San’ka”, “Ephemer”, “Novichok”. Structural and functional reorganization in seeds and fruit buds we study using light and fluorescent microscopy methods. Anatomico-histological studies of tissues we made according to standard statements.

**Results.** We found that bacterial pathogenesis of tomatoes lead to the destruction in chloroplasts, nucleus and in other components. Under the impact of bacterium’s exometabolites in parenchyma of cover tissues of integuments, placenta and mesocarp of fruits form a viscous consistency secret - polysaccharide, which cause significant disturbance of protoplasts, induces the creation of cell walls, leads to chlorotic changes which are followed by necrosis of tissues. **Conclusions.** We suggested the transformations of tissues and cells of reproductive organs of tomatoes in conditions of bakteriozsis divide into 6 main stages.

**Key words:** *Lycopersicon esculentum* Mill., cells components, bakteriozsis.

ПАРХОМЕНКО А.Л.<sup>1</sup>, ПУНИНА Н.В.<sup>2,3</sup>, ЗОТОВ В.С.<sup>2</sup>, ПАРХОМЕНКО Т.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт сельского хозяйства Крыма НААН

Украина, 95453, АР Крым, г. Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: tat.parkhomenko@rambler.ru

<sup>2</sup> Институт биохимии им. АН. Баха РАН

Россия, 11907, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

<sup>3</sup> Медико-генетический научный центр РАМН,

Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

## ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Одним из экологически безопасных методов защиты растений от фитофагов является использование препаратов на основе энтомопатогенной бактерии *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). В мире разработан широкий ассортимент таких препаратов, так как этот биоагент является одним из немногих, эффективных против большинства фитофагов из семейств *Lepidoptera*, *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera* и в то же время безопасных для человека, животных и полезных насекомых [1].

Постепенное расширение ареала фитофагов, связанное с изменением климата, а также появление и развитие резистентных к химическим инсектицидам насекомых требует скри-

нинга новых более эффективных штаммов, изучения их физиолого-биохимических и генетических свойств и оценки эффективности против экономически значимых фитофагов с целью создания на их основе новых микробных препаратов.

Целью нашей работы было провести первичную оценку эффективности новых выделенных из природных популяций фитофагов штаммов *Bt*, определить их физиолого-биохимические и генетические свойства и провести сравнительный анализ с имеющимися штаммами в коллекции с целью их идентификации.

### Материалы и методы

В работе были изучены штаммы из коллекции отдела микробиологии Института сельского хозяйства Крыма НААН: *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 0293 (III серотипа) – аналог штамма биоагента препарата Лепидоцид, *B. thuringiensis*

var. *thuringiensis* 994 (I серотипа) - аналог штамма биоагента препарата Битоксибациллин, *B. thuringiensis* var. *morrisoni* 109 (VIII серотипа), *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis* H<sub>10</sub> (X серотипа), а также новые штаммы *B. thuringiensis* 0376