

**А.М. Кириченко**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна*

## **ВПЛИВ ВІРУСУ ЖОВТОЇ МОЗАЇКИ КВАСОЛІ НА МЕТАБОЛІЗМ ФОТОСИНТЕТИЧНИХ ПІГМЕНТІВ, БІЛКІВ І ВУГЛЕВОДІВ У *GLYCINE SOJA L.***

*Подано дані щодо впливу вірусу жовтої мозаїки кvasолі (ВЖМК), виділеного із сої, що вирощується в Правобережному лісостепу України на метаболізм білків, вуглеводів та фотосинтетичних пігментів у рослинах *Glycine soja L.* Встановлено, що в динаміці розвитку вірусної інфекції вміст фотосинтетичних пігментів, білків та вуглеводів зазнає суттєвих змін, а саме: зниження вмісту хлорофілів а, b і каротиноїдів складає 64 %, 53 % та 36 % порівняно з контрольними рослинами. Значне зростання вмісту вуглеводів (на 56 % порівняно з контролем) спостерігається в кінці дослідного періоду.*

*Ключові слова: *Glycine max (L)*, потівіруси, вірус жовтої мозаїки кvasолі (ВЖМК), хлорофіли, каротиноїди, білки, вуглеводи.*

Соя вирощується в багатьох частинах світу і за посівними площами та валовими зборами зерна є головною зернобобовою культурою світу [12]. Отриманню високих врожаїв цієї культури суттєво стримують велика кількість хвороб і шкідників. У природних умовах сою уражують близько 46 вірусів, основними з котрих є вірус мозаїки сої (*Soybean Mosaic Virus*, рід *Potyvirus*), вірус жовтої мозаїки кvasолі (*Bean yellow mosaic virus*, рід *Potyvirus*), вірус кільцевої плямистості тютюну (*Tobacco ringspot virus*, рід *Nepovirus*), вірус скручування листя сої (*Soybean crinkle leaf virus*, рід *Begomovirus*), вірус звичайної мозаїки кvasолі (*Bean common mosaic virus*, рід *Potyvirus*), вірус мозаїки люцерни (*Alfalfa mosaic virus*, рід *Alfamovirus*), вірус карликовості сої (*Soybean dwarf virus*, рід *Luteovirus*), вірус смугастості тютюну (*Tobacco streak virus*, рід *Illarvirus*). В Правобережному лісостепу України захворювання сої спричинюють два основні віруси – вірус мозаїки сої (ВМС) та ВЖМК (змішана інфекція) [13]. Симптоми ураженої жовтою мозаїкою сої проявляються через 6-14 днів на інкульованих листках у вигляді жовтуватого посвітління жилок. Згодом на тих же та молодих листках вздовж головних жилок з'являється жовта плямистість, яка не зникає до кінця вегетації рослини. Впродовж дозрівання рослин жовтуватість поширюється на всю листкову пластинку, котра залишається рівномірною, без ознак гофрованості та пухирчастості. Спостерігається також ледь помітне скручування листків. Рослини, як правило, не відстають у рості, на бобах ознаки захворювання відсутні. Симптоми, спричинені ВЖМК, значно знижують врожайність рослин та якість отриманого зерна.

Щоб протистояти вірусній інфекції, рослини в процесі еволюції набули ряд стратегій та пристосувань. У процесі розвитку вірусної інфекції в рослині відбувається індукція певних генів та метаболітів, наслідком якої є пригнічення або активація захисних механізмів, що, в свою чергу, призводить до підсилення або, навпаки, до послаблення розвитку вірусної інфекції [7, 19]. За такої взаємодії патогену і хазяїна відбуваються різноманітні фізіологічні зміни в ураженій рослині. Встановлено, зокрема, що патологічний процес в ураженій рослинній тканині супроводжується порушенням структури органел, значними змінами в обміні метаболітів [15]. В першу чергу впливу вірусної інфекції піддається фотосинтетичний апарат. Встановлено, що існує взаємозв'язок між стійкістю рослин до вірусів і стабільністю структури хлоропластів [4]. Адаптація асиміляційного апарату уражених рослин включає в себе як мобілізацію наявних, так і виникнення нових захисних механізмів. Одні механізми є неспецифічними і активуються у відповідь на будь-який стрес, інші (структурні, фізіологічні та біохімічні) є наслідком специфічної реакції на певний стрес. Незважаючи на досить ґрунтовні знання щодо впливу вірусної інфекції на рослинний організм, загальні механізми, що призводять до змін метаболізму і розвитку симптомів хвороби, залишаються невідомими. Відтак, метою нашої роботи було вивчення впливу інфекції, викликаної ВЖМК, на деякі фізіологічні процеси рослин сої, зокрема фотосинтезу, накопичення вуглеводів та білків, тощо.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження були рослини сої *Glycine soja* L. сорту Устя. Дослідні рослини вирощували у вегетаційному будиночку у весняно-літній період за денної температури 20-28°C. Для аналізів відбирали рослини в стадії 4-5 листків. Механічну інокуляцію здійснювали неочищеними екстрактами інфікованих ВЖМК рослин квасолі (*Phaseolus vulgaris*), використовуючи карборунд як абразив. Екстрагентом слугував 0,1М фосфатний буфер (0,2 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , рН 7.0) (ФБ). Контрольні рослини обробляли тим же буфером у присутності карборунду.

Зразки з дослідних та контрольних рослин відбирали в динаміці вірусної інфекції через 1, 4, 8, 14, 21 добу після інокуляції. Клітинні екстракти з листя отримували шляхом гомогенізації листя в 0,1 М ФБ з наступним центрифугуванням (5 тис. об/хв, 10 хв).

Вміст білків та вуглеводів в клітинних екстрактах здорових та інфікованих ВЖМК рослин сої визначали за методом Bradford (1976) [6] та в реакції з 0,2 %-им розчином антрону в концентрованій  $\text{H}_2\text{SO}_4$  [9].

Вміст азоту та сирого протеїну в здорових та інфікованих ВЖМК рослинах сої визначали титриметричним методом за К'ельдалем відповідно до ДСТУ 7169:2010. Масову частку азоту в повітряно-сухий речовині (N) обчислювали за формулою:

$$N = \frac{(V_0 - V_1) \times 0,0014 \times 100}{m} \times \%$$

$V_0$  – об'єм розчину 0,1М NaOH, витраченого на титрування 0,05М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в контрольному зразку, мл;

$V_1$  – об'єм розчину 0,1М NaOH, витраченого на титрування 0,05М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в дослідному зразку,  $\text{cm}^3$ ;

0,0014 – маса азоту, еквівалентна масі 0,05М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в 1 мл розчину;

Вміст сирого протеїну визначали за формулою:

$$w = N \times 5,7, \text{ де}$$

N – масова частка азоту в повітряно-сухий речовині, %;

5,7 – коефіцієнт перерахунку вмісту азоту на сирий протеїн для бобових культур.

Для визначення вмісту пігментів в листках інфікованих та здорових рослин сої використовували спектрофотометричний метод [3]. Проби відбирали у літній денний час, коли відбувалась найбільша активність фотосинтетичного апарату. Пігменти екстрагували 90 %-им етанолом. Оптичну густину витяжок визначали за допомогою спектрофотометра СФ-101 трьоххвильовим методом, визначаючи оптичну густину (E) витяжки при довжині хвилі 665, 649 і 440 нм, що відповідає максимумам поглинання хлорофілу а, хлорофілу b та каротиноїдів відповідно. Концентрацію хлорофілів а і b (C) розраховували за рівняннями Wintermans та De Mots (1965) для етанолу [18]:

$$C_a = 13,70 \cdot E_{665} - 5,76 \cdot E_{649} \text{ (мг/л);}$$

$$C_b = 25,80 \cdot E_{649} - 7,60 \cdot E_{665} \text{ (мг/л).}$$

Концентрацію каротиноїдів у сумарній витяжці пігментів обчислювали за рівнянням Wettstein (1957) [17]:

$$C_k = 4,7 \cdot E_{440} - 0,27 \cdot C_{(a+b)} \text{ (мг/л), де:}$$

$E_{665}$ ,  $E_{649}$  та  $E_{440}$  — оптична густина витяжки при довжині хвилі 665, 649 та 440 нм, відповідно;

C — концентрація пігментів в витяжці, (мг/л).

Визначивши концентрацію пігменту у витяжці, розраховували його вміст у досліджуваній тканині за формулою:

$$F \text{ (мг/г сир. речовини)} = (V \times C) / P$$

де:

F — вміст пігменту в рослинному матеріалі, (мг/г сир.речовини);

V — об'єм витяжки, (л);

C — концентрація пігменту, (мг/л);

P — наважка рослинного матеріалу, (г).

$$C_{a/b} = C_a / C_b$$

**Результати та обговорення.** В результаті спектрофотометричних досліджень нами було встановлено, що через 1 день після інокуляції ВЖМК в уражених та контрольних рослинах сої *G. soja* L. зміни вмісту хлорофілів а та b зазнають незначних коливань, що пов'язано, очевидно, з природними фізіологічними особливостями рослинного організму. Відносні зміни вмісту пігментів в екстрактах інфікованих ВЖМК рослин коливались залежно від тривалості інфекційного процесу. Так, через 4 дні після інокуляції вірусом не спостерігалось значних змін концентрації як хлорофілу а, так і хлорофілу b (табл. 1). Кількісні показники вмісту хлорофілів а та b через 8 днів після інокуляції були на 58 % та 45 %, відповідно, нижчими, ніж в контролі. Необхідно зазначити, що різке зниження вмісту хлорофілів не корелювало з появою перших симптомів, викликаних вірусною інфекцією. Так, посвітління жилок листової пластинки, поодинокі жовті плями чи полоси уздовж основних жилок з'явилися на 14-й день інокуляції як в інокульованих, так і системно інфікованих молодих листках дослідних рослин, тоді як різке зниження вмісту пігментів спостерігалось уже через 8 діб після інокуляції. Тенденція до спаду вмісту хлорофілів в екстрактах інфікованих рослин зберігалась до кінця досліджу: на 21-шу добу співвідношення між дослідом та контролем не відрізнялось від такого на 25-ту добу після інокуляції вірусом.

Таблиця 1

**Вплив вірусної інфекції на вміст фотосинтетичних пігментів**

	Вміст пігментів											
	4 дні			8 днів			14 днів			21 день		
	К	Д	Д/К	К	Д	Д/К	К	Д	Д/К	К	Д	Д/К
Хлорофіл а	1,86	1,78	0,96	1,81	0,75	0,42	1,79	0,68	0,38	1,83	0,67	0,36
Хлорофіл b	0,71	0,7	0,99	0,69	0,38	0,55	0,67	0,34	0,51	0,66	0,31	0,47
Каротиноїди	0,55	0,59	1,07	0,53	0,48	0,9	0,30	0,19	0,63	0,31	0,20	0,64
Chla/Chlb	2,62	2,54		2,62	1,97		2,67	2,0		2,77	2,16	

**Примітки:** К – здорові рослини; Д – інфіковані ВЖМК рослини

Показники співвідношення Chla/Chlb дослідниками використовуються для оцінки ступеня впливу вірусної інфекції на рослину [16]. Так, за [16] зниження показників Chla/Chlb за вірусної інфекції може свідчити про спрямованість метаболічних процесів у бік запасання асимілятів, деградації ламел та зростання  $PS_{II}/PS_{I}$  показників, що призводить до підсилення синтезу АТФ, а також про руйнування реакційних центрів фотосистеми II ( $PS_{II}$ ) внаслідок пролонгованого порушення транспорту електронів у процесі фотосинтезу.

Так, на ранніх етапах інфекції співвідношення хлорофілів а і b в інфікованих ВЖМК рослинах майже не відрізнялось від контролю, однак спостерігається суттєве зниження цього параметра на більш пізніх етапах інфекційного процесу.

Стійкість рослин до патогену визначається в основному їх здатністю до швидких адаптацій, де певну роль виконують низькомолекулярні полієнові сполуки, що містять систему спряжених подвійних зв'язків, – каротиноїди [5]. Ці поліізопреноїдні пігменти входять до складу антенних комплексів та реакційних центрів і виконують захисну функцію, захищаючи органічні речовини (в першу чергу молекули хлорофілу) від пошкодження у процесі фотоокиснення [2]. Завдяки своїм фізико-хімічним властивостям вони здатні створювати оптимальні умови для функціонування фотосинтезуючих клітин мембран хлоропластів. Різке зниження вмісту каротиноїдів через 14 діб після інокуляції свідчить про значні порушення антиоксидантних систем інфікованих рослин, що призводить до порушеної рівноваги транспорту електронів до  $O_2$  та надмірного синтезу видів реактивного кисню.

Зниження вмісту пігментів фотосинтезу є наслідком пошкодження фотосинтетичного апарату рослин, позаяк ряд метаболічних змін, спричинених вірусною інфекцією в тканинах ураженої рослини, залежить від локальних змін в структурі і функціях хлоропластів [11]. Однак ці пошкодження не можуть бути обмежувальним фактором у біосинтезі цукрів та білків [8]. За результатами наших досліджень, ВЖМК по різному впливає на зміни вмісту розчинних білків та вуглеводів у рослинах сої за вірусної інфекції. Зниження вмісту білків в екстрактах

інфікованих рослин були незначними та поступовими і через 3 тижні після інокуляції вірусом кількісні показники склали 86 % від контролю (рис. 1). Незначним було зниження вмісту сирого протеїну в інфікованих рослинах порівняно з інтактними впродовж перших 14 днів інфекції (на 6 %), однак на 21 день різниця була більш вагомою і становила 16 % (табл. 2). У той же час спостерігалось значне зростання вмісту вуглеводів (на 56 % порівняно з контролем) у кінці дослідження. Очевидно, за вірусної інфекції значного впливу зазнають структури та механізми, які впливають на процеси накопичення, транспортування та розподілу вуглеводів в рослині-хазяїні. Таке накопичення розчинних цукрів може впливати на регуляцію генів і призводити до репресії (пригнічення функції) генів, залучених у процеси фотосинтезу [10].

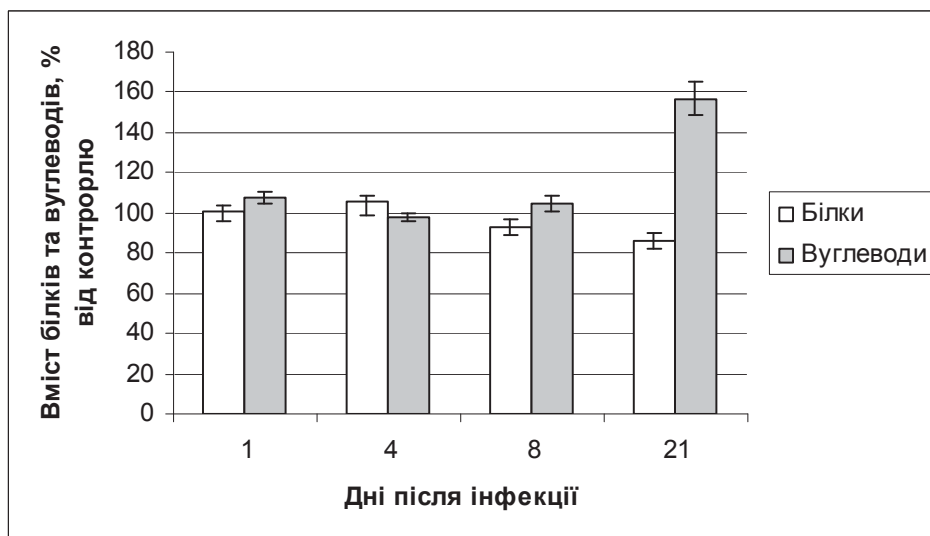


Рис. 1. Вплив вірусної інфекції на вміст білків і вуглеводів

Таблиця 2

Вплив вірусної інфекції на вміст сирого протеїну

Варіант	Сирий протеїн, мг/г сухої речовини				
	Тривалість інфекції, дні				
	1	4	7	14	21
Дослід	34,41±0,20	37,48±0,10	36,33±0,12	25,00±0,09	19,76±0,09
Контроль	37,55±0,17	39,55±0,08	38,36±0,20	26,45±0,10	23,58±0,10
Д/К	0,92	0,94±	0,94	0,94	0,84

К – здорові рослини; Д – інфіковані ВЖМК рослини

Таким чином, інфікування рослин *G. soja* ВЖМК призводить до зниження експресії фотосинтетичних білків і, як наслідок, до пригнічення фотосинтетичної здатності хлоропластів, змін метаболізму білків та вуглеводів. Очевидно, що більшість змін безпосередньо пов'язані з підтримкою вірусної реплікації та адаптаційними змінами рослинного організму в умовах стресу, викликаного вірусною інфекцією. Однак такі зміни, як накопичення розчинних цукрів чи зворотне інгібування генів залучених у процеси фотосинтезу можуть брати участь у функціонуванні захисних властивостей рослинного організму.

*А.Н. Кириченко*

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев*

## **ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ЖЁЛТОЙ МОЗАИКИ ФАСОЛИ НА МЕТАБОЛИЗМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПИГМЕНТОВ, БЕЛКОВ И УГЛЕВОДОВ В *GLYCINE SOJA* L.**

Резюме

Представлены данные о влиянии вируса желтой мозаики фасоли (ВЖМФ), выделенного из сои, выращиваемой в Правобережной лесостепи Украины на метаболизм белков, углеводов и фотосинтетических пигментов в растениях *Glycine soja* L. Установлено, что в динамике развития вирусной инфекции содержание фотосинтетических пигментов, белков и углеводов существенно изменяется, а именно: снижение содержания хлорофиллов а, б и каротиноидов составляет 64 %, 53 % и 36 % по сравнению с контрольными растениями. Значительный рост содержания углеводов (на 56 % по сравнению с контролем) наблюдается в конце опытного периода.

Ключевые слова: *Glycine max* (L.), потивирусы, вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ), хлорофиллы, каротиноиды, белки, углеводы.

*А.М. Kyrychenko*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **INFLUENCE OF BEAN YELLOW MOSAIC VIRUS ON METABOLISM OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS, PROTEINS AND CARBOHYDRATES IN *GLYCINE SOJA* L.**

Summary

This paper presents data on BYMV effects on some physiological processes of *Glycine soja* L. cultivated in the right-bank forest-steppe regions. Pigment content (chlorophyll a, b and carotenoids), soluble proteins and water soluble carbohydrates were estimated and, as has been shown, are subjected to significant changes as compared with control plants, namely: a decrease in the content of chlorophyll a, b and carotenoids was 64%, 53% and 36% compared with the control plants. The significant increase in carbohydrates (56% compared to the control) was observed at the end of the test period.

The paper is presented in Ukrainian.

Keywords: *Glycine max* (L.), potyviridae, bean yellow mosaic virus (BYMV), chlorophylls, carotenoids, proteins, carbohydrates.

The authors address: *Kyrychenko A.M.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. ДСТУ 7169:2010. Методи визначення вмісту азоту і сирого протеїну.
2. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. – М.: Наука, 1988. – 240 с.
3. Починюк Х.Н. Методы биохимического анализа растений. – Киев: Наук. думка, 1976. – С. 213–216.
4. Тихонов А.Н. Защитные механизмы фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал. – 1999. – 11. – С. 16–21.
5. Чепалов В.А., Нохсоров В.В., Петров К.А. Роль каротиноидов в адаптации побегов пшеницы к низкотемпературному стрессу // Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии. – 2010. – 433 с.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – 72. – P. 248–254.
7. Culver J.N., Padmanabhan M.S. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time // Annual. Rev. Phytopathol. – 2007. – 45. – P. 221–243.
8. Farghly F.A. Physiological response of some wheat cultivars to salinity stress // M.Sc. Thesis, Bot. Dept., Faculty of Sci., Assiut Univ, 2001. – Egypt.
9. Fales F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 113–124.
10. Gonçalves M.C., Vega J., Oliveira J.G., Gomes M. A. Sugarcane yellow leaf virus infection leads to alterations in photosynthetic efficiency and carbohydrate accumulation in sugarcane leaves // Fitopatol. bras. – 2005. – 30, N 1. – P. 10–16.
11. Goodman R.N., Kiraly Z., Wood K.R. The biochemistry and physiology of plant disease // Columbia, MO, USA: Univ. Missouri Press, 1986.

12. *Jideani V. A.* Functional properties of soybean food ingredients in food systems. Soybean – Biochemistry, Chemistry and Physiology / Ed by Prof. Tzi-Bun Ng. – 2011. – 642 p.
13. *Kyrychenko A.M., Kraeva G.V., Kovalenko O.G.* Biological characteristic and identification of soybean viruses isolated from different Ukrainian regions // Мікробіол. журн. – 2012. – **74**, N 1. – С. 46–51.
14. *Mohanty S.K., Sridhar R.* Physiology of rice tungro virus disease: changes in leaf pigments due to infection // Acta phytopathol. entomol. (Hung.) – 1989. – **24** – P. 375–386.
15. *Naidu R.A., Krishnan M., Nayudu M.V., Gnanam A.* Studies on peanut green mosaic virus infected peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaves. III. – Changes in the polypeptides of photosystem II particles // Physiol. and Mol. Plant Path. – 1986. – **29**. – P. 53–58.
16. *Tinoco-Ojanguren C., Percy Y.R.W.* A comparison of light quality and quantity effects on the growth and steady-state and dynamic photosynthetic characteristics of three tropical tree species // Functional Ecology. – 1995. – **9**. – P. 222–230.
17. *Wettstein D.* Formula of chlorophyll determination // Exp. Cell Res. – 1957. – **12**, N 3. – P. 427–489.
18. *Wintermans F.G.M., De Mots A.* Chlorophyll determination. A suitable method for *Chlamydomonas* // Biochim. biophys. acta. – 1965. – **109**. – P. 448–453.
19. *Whitham S.A., Yang C., Goodin M.M.* Global impact: elucidating plant responses to viral infection // Mol. Plant Microbe Interact. – 2006. – **19**. – P. 1207–1215.

Отримано 20.01.2013