

## **ВПЛИВ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ РОСЛИН ЛЮПИНУ ЖОВТОГО ЗА ВИКОРИСТАННЯ БІОПРЕПАРАТІВ**

**Пиріг О.В., Волкогон В.В., Коломієць Л.П.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології  
та агропромислового виробництва НААН,  
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна  
E-mail: altrockman@mail.ru

*Досліджено вплив вірусної інфекції на активність ферментів рослин люпину жовтого за використання біопрепаратів. При ураженні люпину вірусом жовтої мозаїки квасолі відмічено підвищення активності каталази та рибонуклеази. Зниження активності ферментів у листках інфікованих рослин при застосуванні мікробних препаратів може свідчити про посилення захисних функцій рослинного організму.*

*Ключові слова: люпин жовтий, вірусна інфекція, каталаза, рибонуклеаза, біопрепарати.*

Вивчення взаємодії вірус-макроорганізм – одне з центральних завдань сучасної вірусології. Оскільки фітопатогенні віруси не мають ферментативної системи, то для своєї репродукції вони індукують синтез специфічних полімераз, використовуючи ферменти, субстрат та енергію клітини. Клітина активно реагує на проникнення патогену. Одна з таких реакцій – зміна активності ферментів, зокрема рибонуклеази та каталази [1, 2].

Рибонуклеаза є ключовим ферментом обміну рибонуклеїнових кислот. Цьому ферменту також належить відповідна роль у захисних реакціях клітини при проникненні патогену. Підвищення активності РНК-ази у зв'язку з реакцією рослини на інфекцію відмічено рядом дослідників. Ю.І. Власов у своїх роботах зазначив, що різні сорти томатів, уражених тютюновою мозаїкою, мають підвищений рівень активності цього ферменту, а також встановив, що чим вище патогенність штаму вірусу, тим вища активність рибонуклеази [8]. В.А. Пантюхіна, В.Г. Рейфман дослідили вплив

вірусів Х-картоплі і тютюнової мозаїки на рибонуклеазну активність рослин-хазяїв (*Nicotiana tabacum* L. та *Datura stramonium* L.) у процесі розвитку інфекції. Автори довели, що РНК-азна активність у листках рослин підвищується за механічних пошкоджень і розмноженні в них вірусів та є неспецифічною реакцією рослин: при зараженні методом механічної інокуляції підвищення активності ферменту у перший період обумовлено пошкодженням тканин, у подальшому є результатом вірусної інфекції [1]. У роботі японських науковців показана позитивна кореляція між активністю РНК-ази і ступенем прояву симптомів на рослинах рису, уражених вірусом штрихуватості [9].

Каталаза – компонент комплексного ферментативного захисту рослини від токсичних сполук кисню – каталізує реакцію трансформації пероксиду водню у воду та молекулярний кисень [3–5]. У рослинній клітині каталаза локалізована в пероксисомах – органелах, що мають ферментативну систему утворення і утилізації пероксиду водню та інших реакційно здатних сполук, і гліоксисомах (спеціалізована форма пероксисом, яка містить ферменти метаболізму ліпідів). Генерація пероксиду водню відбувається головним чином у мембранах: клітинних стінках рослин, ядерній та плазматичній мембранах, мембранах мітохондрій, хлоропластах, пероксисомах. Як правило, кількість каталази у клітинах достатня, щоб запобігти невеликій кількості пероксиду водню проявити потенційну токсичність [3]. Однак, при багатьох патофізіологічних процесах утворюються супероксидні радикали, які токсичні для живої клітини. Чужорідний організм атакується активними формами кисню, що призупиняє проникнення патогену, але призводить до деградації окремих клітин рослини-хазяїна [3, 6].

Літературні дані щодо значення каталази у формуванні взаємовідносин рослина-патоген суперечливі. Може відбуватися як підвищення активності ферменту, наприклад, у рослинах перцю при інфікуванні вірусом тютюнової мозаїки, так і зниження – при ураженні пшениці стебловою іржею (грибна інфекція). Проте, активність каталази ілюструє імунну відповідь рослин на вплив патогенів, оскільки в стресових

для рослин умовах відбувається зміна активності даного фермента [2, 7].

Дослідження, проведені вченими багатьох країн, показали, що препарати хімічного і біологічного походження можуть викликати системну індуковану стійкість рослин до патогенів, тобто стимулювати захисні реакції рослинного організму.

Метою даної роботи було дослідження впливу вірусної інфекції на каталазну та рибонуклеазну активність у рослинах люпину жовтого за передпосівної обробки насіння мікробними препаратами.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили впродовж 2010–2012 рр в лабораторії вірусології і на дослідних ділянках Інституту сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН.

Об'єктом досліджень були рослини люпину жовтого (*Lupinus luteus* L.) сорту Прогресивний, уражені вірусом жовтої мозаїки квасолі (*Bean yellow mosaic virus*, ВЖМК).

Схема польового дослідження включала наступні варіанти: 1. обробка насіння водою (контроль); 2. Ризобофіт (на основі *Rhizobium lupini* штам 367а); 3. Ризогумін (на основі *Rhizobium lupini* штам 367а та оптимізованого для рослин вмісту фітогормонів); 4. Хетомік (біологічний агент *Chaetomium cochliodes* 3250). Повторність дослідження – чотириохкратна. Розміщення ділянок – рендомізоване. Площа облікової ділянки складала 10 м<sup>2</sup>. Дослідження проводили в умовах природного інфікування люпину жовтого вірусом жовтої мозаїки квасолі.

З метою виключення абіотичних та біотичних факторів, присутніх за умов польового дослідження, провели також вегетаційний дослід з визначення впливу біопрепаратів на перебіг вірусної інфекції в рослинах люпину жовтого за штучного ураження ВЖМК. Схема дослідження: 1. без обробки біопрепаратами (контроль); 2. Ризобофіт; 3. Ризогумін; 4. Хетомік. Повторність 6-кратна. Насіння висівали у стерильний пісок з додаванням поживної суміші Прянішнікова.

Передпосівну обробку насіння мікробними препаратами проводили з розрахунку 200–300 тис. бактеріальних клітин (Ризобофіт, Ризогумін) та 150 тис. сумкоспор гриба (Хетомік) на

насінину.

Ідентифікацію вірусу в зразках проводили за допомогою наступних методів: симптоматології, рослин-індикаторів, електронної мікроскопії, ІФА [10–15].

Інтенсивність вірусного ураження рослин люпину визначали за чотирьохбальною шкалою [16]. Розвиток хвороби розраховували за формулою:

$$P = \frac{\sum (a \times b) \times 100}{K},$$

де  $Px$  – розвиток хвороби, %;  $a$  – число рослин з однаковими ознаками ураження;  $b$  – відповідний цій ознаці бал ураження;  $\sum (a \times b)$  – сума добутку числових показників ( $a \times b$ );  $A$  – кількість рослин (здорових і хворих);  $K$  – вищий бал облікової шкали [16].

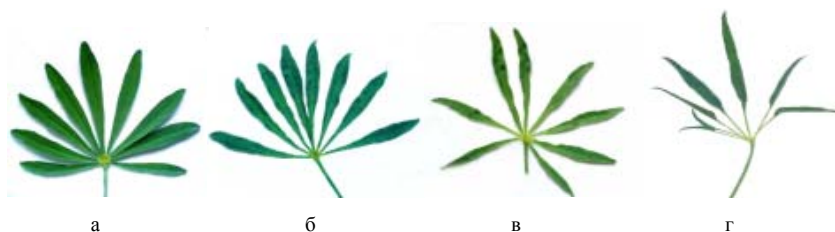
Активність РНК-ази в листках люпину жовтого визначали за методикою А.К. Chakravorty. За одиницю активності приймали таку кількість ферменту, яка приводила до збільшення оптичної густини ( $E_{260}$ ) на одну оптичну одиницю (0,010) у перерахунку на всю пробу [1, 8].

Активність каталази визначали методом, що ґрунтується на взаємодії пероксиду водню з йодистим калієм. Ферментативну активність каталази вираховували за формулою  $A=D \cdot 0,02$ , де  $A$  – активність каталази у пробі;  $D$  – оптична густина досліджуваної проби; 0,02 – коефіцієнт перерахунку в умовні одиниці активності каталази (од. акт.) [17].

**Результати та обговорення.** На посівах люпину жовтого сорту Прогресивний, починаючи з фази розетки, та у вегетаційному досліді за механічної інокуляції рослин ВЖМК відмічали появу симптомів ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі. Першою ознакою хвороби була вузьколистість молодих листків. У подальшому вузьколистість різного ступеня вираженості супроводжувалася деформацією листкової пластинки, на листках з'являлися темно-зелені пухирчасті плями різної величини (рис. 1).

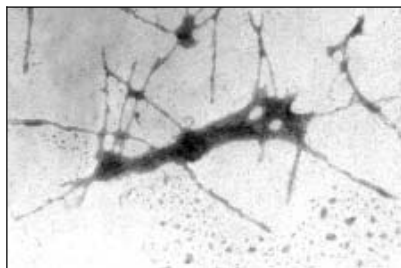
За ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі розвиток інфекції відбувається з проявленням характерних симптомів, які сут-

тево відрізняються від симптомів інших хвороб, що дає можливість диференційної діагностики захворювання при проведенні польових обстежень.

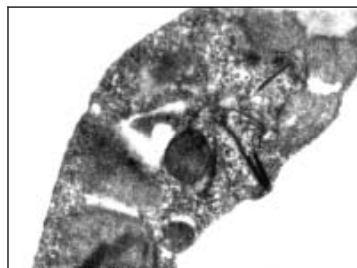


*Рис. 1. Симптоми ураження ВЖМК на листках люпину жовтого сорту Прогресивний: а – листок здорової рослини; б, в, г – різні ступінь вузьколистості, яка супроводжується мозаїкою та деформацією листків*

Комплексний вірусологічний аналіз рослин люпину жовтого з типовими ознаками вузьколистості виявив присутність ВЖМК, при електронномікроскопічному дослідженні у нативних препаратах соку листя уражених рослин спостерігали вірусні частки, відповідні за морфологією і розмірами (довжина – 750 нм, діаметр – 15 нм) ВЖМК (рис. 2). В ультратонких зрізах листків тест-рослин при проведенні біотестування виділених ізолятів виявляються вірусоспецифічні включення (структури Едвардсона), які є ознакою потивірусної інфекції (рис. 3).

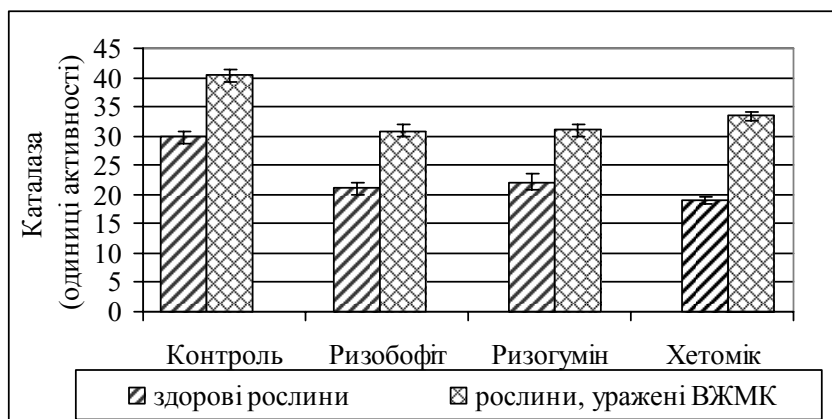


*Рис. 2. Вірус жовтої мозаїки квасолі (інструментальне збільшення  $\times 20\ 000$ )*



*Рис. 3. Вірус-індуковані включення (структури Едвардсона), інструментальне збільшення  $\times 22000$*

Для визначення активності каталази та рибонуклеази використовували листя здорових та інфікованих рослин люпину, які відбирали у фазу цвітіння. При порівнянні активності ферментів у здорових та уражених вірусом рослинах контрольного варіанту (без застосування біопрепаратів) виявлено, що вірусна інфекція призводить до значного підвищення активності ферментів, особливо РНК-ази. В листках уражених ВЖМК рослин найвищу активність каталази спостерігали в контролі – 40,4 од. акт., що перевищувало показники здорових рослин на 26,2 %, рибонуклеазна активність підвищувалася на 84,5 од. акт. (83,5 %) у порівнянні зі здоровими (рис. 4 і 5).



*Рис. 4. Активність ферменту каталази у листках здорових та уражених вірусом жовтої мозаїки квасолі рослин люпину жовтого*

У варіантах із застосуванням біопрепаратів відмічено зниження активності каталази в уражених ВЖМК рослинах при застосуванні Ризобофіту на 9,5 од. акт. (23,5 %), Ризогуміну – 9,4 од. акт. (23,2 %), Хетоміка – 7,0 од. акт. (17,3 %) у порівнянні з інфікованими рослинами контрольного варіанту, що може свідчити про краще перенесення рослинами стресового стану, спричиненого вірусною інфекцією.

При визначенні активності РНК-ази в здорових та інфікованих рослинах найвищий рівень активності ферменту спостерігали у

контролі (рослини люпину жовтого, уражені ВЖМК) – 100,6 од. акт. На фоні застосування мікробних препаратів активність рибонуклеази значно знижувалася в інфікованих рослинах: у варіанті з Ризобофітом на 53,0 од. акт (47,3 %), Ризогуміном – 58,7 од. акт (58,3 %), Хетоміком – 66,8 од. акт. (66,4 %), що також може свідчити про менший негативний вплив вірусної інфекції (рис. 5).



*Рис. 5. Активність ферменту РНК-ази у листках здорових та уражених вірусом жовтої мозаїки квасолі рослин люпину жовтого*

Отримані дані вегетаційного дослідження корелюють з результатами польових дослідів та свідчать про позитивний вплив біопрепаратів на досліджувані показники рослин люпину жовтого за ураження ВЖМК.

У дослідженнях спостерігали залежність між рівнем активності ферментів та інтенсивністю розвитку вірусного ураження рослин. Ступінь розвитку хвороби в рослинах контрольного варіанту (уражені рослини без застосування біопрепаратів) був найбільшим – 48,2 %, як і рівень каталази та рибонуклеази. За використання біопрепаратів Ризобофіту, Ризогуміну, Хетоміка розвиток хвороби становив 27,3 %, 22,6 % і 23,0 %, відповідно, що на 20,9 %, 25,6 % і 25,2 % менше, ніж у контролі (рис. 6). Прослідковується позитивна кореляція між активністю РНК-ази і ступенем розвитку симптомів на рослинах люпину, що співпадає з літературними даними.

У вегетаційному досліді, за використання ІФА, виявили також зниження концентрації вірусу в рослинах за передпосівної інокуляції насіння біопрепаратами на 16,8–23 % (табл.). Тобто, спостерігається зниження інтенсивності репродукції вірусу, що, на нашу думку, зумовлює зниження інтенсивності розвитку симптомів захворювання на ураженнх ВЖМК рослинах люпину жовтого в умовах польового і вегетаційного дослідів.

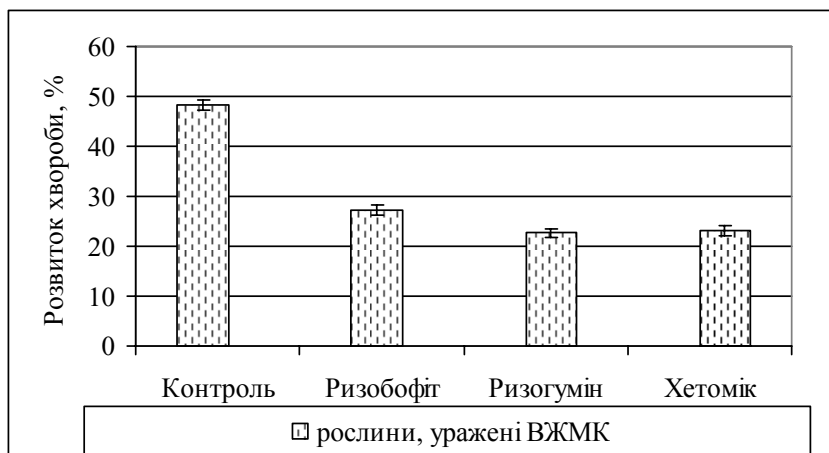


Рис. 6. Інтенсивність розвитку симптомів вірусного ураження на рослинах люпину жовтого

Таблиця. Вплив біопрепаратів на накопичення ВЖМК в рослинах люпину жовтого сорту Прогресивний (ІФА, вегетаційний дослід)

| Варіанти досліджу                                    | Концентрація вірусу (одиниць оптичної густини) | Різниця до контролю, % |
|--|--|------------------------|
| Негативний контроль «←» (без обробки біопрепаратами) | 0,231±0,010                                    | –                      |
| Позитивний контроль «+» (без обробки біопрепаратами) | 0,487±0,011                                    | –                      |
| Ризобіфіт  | 0,417±0,009                                    | 16,8                   |
| Ризогумін  | 0,396±0,003                                    | 23,0                   |
| Хетомік  | 0,405±0,005                                    | 20,2                   |



Проведені нами дослідження показали підвищення активності ферментів каталази та рибонуклеази в інфікованих ВЖМК рослинах люпину жовтого як відповідь на зараження вірусом. Відмічено позитивний ефект використання мікробних препаратів, що сприяє посиленню захисних реакцій рослинного організму, його здатності протистояти розвитку вірусної інфекції.

1. Пантюхина В.А. Рибонуклеаза листьев растений, пораженных вирусами /Пантюхина В.А., Рейфман В.Г., Казачкова Л.А. //Вирусные болезни растений и меры борьбы с ними. – Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1980. – С. 14–20.

2. Д'ячкова О.О. Фізіологічні реакції перцю (*Capsium annuum* L.) на вірусну інфекцію: автореф. дис. ... канд. біол. наук: спец. 03.00.02 «Біофізика» /О.О. Д'ячкова. – К., 2003. – 27 с.

3. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы /Мирошниченко О.С. //Биополимеры и клетка: научно-теорет. журн. – 1992. – Т. 8, № 6. – С. 3–21.

4. Сергієнко В.Г. Вплив біологічних препаратів на активність окисно-відновних препаратів рослин томатів /Сергієнко В.Г., Чергіна О.Д. //Захист і карантин рослин: міжвід. темат. наук. зб. – К., 2011. – Вип. 57. – С. 179–188.

5. Медведев С.С. Физиология растений: учебник /С.С. Медведев. – СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2004. – 336 с.

6. Игамбердиев А.У. Роль пероксисом в организации метаболизма растений /Игамбердиев А.У. //Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 20–26.

7. Семенова Е.А. Энзиматическая активность инфицированных листьев *Glycine max* и *Glycine soja* /Семенова Е.А., Титова С.А., Дубовицкая Л.К. //Фундаментальные исследования. – 2011. – № 12, Ч. 4. – С. 708–711.

8. Власов Ю.И. Биохимический метод оценки патогенности штаммов вируса табачной мозаики на томатах: методические указания /Ю.И. Власов. – Л.-Пушкин, 1981. – 6 с.

9. Kiso A. Infection and symptom development in rice stripe disease, with special reference to disease-specific protein other than virus /Kiso A., Yamamoto T. //Rev. Plant Protect. Res. – 1973. – Vol. 6. – P. 75–100.

10. Гутникова З.И. Растения-индикаторы вирусов растений

/З.И. Гутникова, А.В. Крылов. – Владивосток : Биолого-почвенн. ин-т, 1980. – 222 с.

11. Kado C.I. Mechanical and Biological Inoculation Principles /C.I. Kado, H.O. Agriwal //Principles and Techniques in Plant Virology. – NY : van Nostran-Reinhold, 1972. – P. 4–31.

12. Дунин М.С. Капельный метод анализа вирусов в растениеводстве /М.С. Дунин, Н.М. Попова. – М. : Сельхозгиз, 1937. – 47 с.

13. Гнутова Р.В. Серология и иммунохимия вирусов растений /Р.В. Гнутова. – М. : Наука, 1993. – 301 с.

14. Развязкина Г.М. Упрощенный метод обнаружения в электронном микроскопе вирусных частиц из сока растений /Развязкина Г.М., Полякова Г.П., Штейн-Марголина В.А. //Вопр. вирусол. – 1968. – № 5. – С. 633–934.

15. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих /Б. Уикли. – М. : Мир, 1975. – 314 с.

16. Шмидт Э. Вирусные болезни люпина и создание устойчивых форм для селекции /Шмидт Э., Шпаар Д. //Вестн. с.-х. науки. – М. : Колос, 1981. – № 9. – С. 32–43.

17. Пат. 2027171 РФ, G 01 N 21/78. Способ определения активности каталазы в биологических объектах /В.Г. Шиманов, Т.Х. Худайкулович, С.Ю. Кучинский, С.Д. Аслидинов, Р.А. Халиков; заявитель и патентообладатель Узбекский научно-исследовательский институт каракулеводства. – № 5000829/25; заявл. 05.07.91; опубл. 20.01.1995.

## **ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ЛЮПИНА ЖЁЛТОГО ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОПРЕПАРАТОВ**

**Пирог А.В., Волкогон В.В., Коломиец Л.П.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Исследовано влияние вирусной инфекции на активность ферментов люпина жёлтого при использовании биопрепаратов. При заражении люпина вирусом жёлтой мозаики фасоли отмечено повышение активности каталазы и рибонуклеазы. Снижение активности ферментов в листьях инфицированных растений при использовании микробных препаратов может свидетельствовать об усилении защитных функций растительного организма.*

Ключевые слова: *люпин жёлтый, вирусная инфекция, каталаза, рибонуклеаза, биопрепараты.*

## **INFLUENCE OF VIRAL INFECTION ON ACTIVITY OF ENZYMES OF YELLOW LUPINE AT THE USE OF BIOPREPARATIONS**

**Pirog A.V., Volkogon V.V., Kolomiets L.P.**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The influence of viral infection on the enzymes activity of yellow lupine at the use of biopreparations were investigated. At lupine infection with bean yellow mosaic virus the increase in catalase and ribonuclease activity was observed. Reduction in the activity of enzymes in leaves of infected plants under the use of biopreparations may indicate the increase of defense functions in plant organism.*

Key words: *yellow lupine, viral infection, catalase, ribonuclease, biopreparations.*