Гринчук К.В.

УДК 577.1:632.38:635.652

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ РЕЧОВИН ЯК ПОТЕНЦІЙНИХ МАРКЕРІВ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ КВАСОЛІ ЗВИЧАЙНОЇ

К. В. ГРИНЧУК, кандидат біологічних наук, кафедра молекулярної біології,
мікробіології та біобезпеки

Національний університет біоресурсів і природокористування України

E-mail: blackgrampus@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.06.013>

Анотація. Досліджено рослини квасолі на наявність вірусної інфекції та встановлено присутність змішаної інфекції. Показано, що початкові стадії вірусної інфекції супроводжуються зниженням вмісту в листках каротиноїдів і хлорофілів, а також якісною зміною в складі продуктів фенілпропаноїдного синтезу. Таким чином у листках квасолі виділено три групи фенольних речовин, серед яких сполуки - маркери змішаної вірусної інфекції, викликані вірусом звичайної мозаїки квасолі та вірусом жовтої мозаїки квасолі, маркер відсутності вірусної інфекції і група речовин, які не мають вираженого зв'язку з вірусним навантаженням. Також встановлено, що вірус мозаїки сої був ідентифікований лише умовах змішаної інфекції у присутності вірусів звичайної мозаїки квасолі та жовтої мозаїки квасолі. Отже, нами виявлено потенційні біохімічні маркери вірусної інфекції в листках квасолі звичайної.

Ключові слова: квасоля, вірус звичайної мозаїки, вірус жовтої мозаїки, фенольні сполуки, флавоноїди

Актуальність. Деструктивні процеси у тканинах вегетативних та генеративних органів рослин супроводжуються суттєвим збільшенням синтезу вторинних метаболітів у протопластах і клітинних стінках тканин, схильних до негативного впливу біотичних факторів [6, 9]. Одним з механізмів захисту рослин від фітопатогенів є синтез похідних фенілпропаноїдів [5], сесквітерпеноїдів, ізофлавоноїдів, дігідрофенантренив та інших з'єднань, здатних порушувати цілісність цитоплазматичних мембран

фітопатогенних організмів приймати участь в каскадах складних біохімічних перетворень, що сприяють формуванню у рослинному організмі індукованої системної стійкості. Особлива роль у формуванні конституціональної і індукованої стійкості рослин належить специфічним білкам, а також оксидазі і гідролітичним ферментам [1, 13]. Ефективною реакцією рослини на вірусну інфекцію є синтез саліцилової кислоти (СК), здатної пригнічувати реплікацію і транслокацію вірусів у

Гринчук К.В.

тканинах рослин [10, 11]. У кон'югованій формі СК утворює метилсалицилат, який підвищує експресію генів PR-1 білків (pathogenesis-related) і сприяє розвитку реакції системної стійкості рослин до патогенів [12]. Місцем синтезу і накопичення СК і багатьох інших фенольних сполук є хлоропласти, звідки вони переносяться в цитоплазму, вакуолі і транспортується по флоєме у віддалені частини рослини.

Мета дослідження – виявити потенційні біохімічні маркери вірусної інфекції в листках квасолі звичайної.

Матеріали і методи дослідження. Об'єктами дослідження були вірус звичайної мозаїки квасолі (bean common mosaic virus, BCMV), вірусу жовтої мозаїки квасолі (bean yellow mosaic virus, BYMV) та вірус мозаїки сої (soybean mosaic virus, SMV). Дослідження

проводили на рослинах квасолі звичайної сорту Перлина. Листя відбирали із середньої частини стебла з урахуванням ступеня прояву патогенних процесів: точкових і межжилковий хлорозів, некрозів. Також проводили діагностику вірусних інфекцій на деяких рослинах верхніх та нижніх ярусах листків. Тотальна РНК екстрагували з рослинного матеріалу з використанням комерційного набору РИБО-сорб (AmpliSens, Росія). Реакцію зворотної транскрипції проводили з використанням комерційного набору «Реверта» (AmpliSens, Росія) за рекомендаціями виробника. Діагностику та ідентифікацію вірусів, які вражають бобові проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням розроблених діагностичних тест-систем [2, 3, 4] (таблиця 1).

1. Послідовності праймерів для проведення ПЛР аналізу

Назва	Положення	Нуклеотидна послідовність 5'-3'	Температура відпалу, °C	п.н.
BYMV1	Прямий	ccaacattccgccaataat	60	266
BYMV2	Зворотній	tctgtccaacattgccatc	60	
SMV1	Прямий	tgcagcagaagcttacattga	60	194
SMV2	Зворотній	tgtaactcccagagagctg	60	
BCMV1	Прямий	tgtggtacaatgctgtgaagg	60	391
BCMV2	Зворотній	gccttcattctgtgctactgct	60	

ПЛР проводили в об'ємі реакційної суміші – 25 мкл (реагенти AmpliSens, Росія) з використанням

5 пкмоль кожної пари праймерів. Ампліфікацію проводили на приладі Applied Biosystems 2400. Умови

Гринчук К.В.

проведення реакції: початкова денатурація 94 °C – 5 хв, далі 35 циклів при наступних умовах: денатурація 94 °C – 30 с, ренатурація (гібридизація) 60 °C – 30 с, елонгація 72 °C – 30 с. Заключний цикл – фінальна елонгація 72 °C – 7 хв. Електрофорез продуктів ампліфікації проводили в 2 % агарозному гелі в ТАЕ-буфері з використанням маркера молекулярних мас GeneRule™ 100 bp DNA Ladder і УФ візуалізацією з бромистим етидієм.

Якісний аналіз фенольних сполук у тканинах листках досліджували методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) на пластинках Silicagel G60 (Merck) у системі розчинників: етилацетат – мурашина кислота – оцтова кислота – вода (v/v/v/v – 100/11/11/26).

Для виявлення на хроматограмі індивідуальних речовин пластинку після ретельного просушування обробляли 0,5% розчином дифенілборилоксиетиламіном в етилацетаті і 5% поліетиленгліколем у дихлорметані і нагрівали до 100 °C впродовж 5 хв. Візуалізацію індивідуальних продуктів на

хроматограмі проводили в УФ ($\lambda=365$ нм). Показники R_f та інтенсивність флуоресценції індивідуальних сполук визначали фотоденситометрично за використання комп'ютерної програми *Sorbfil TLC*.

Спектрофотометричні дослідження пігментів і фенольних сполук у метанольних екстрактах (v/v – 1/10) листків здорових і інфікованих вірусами рослин, проводили на однопроменевому сканувальному спектрофотометрі Optizen Pop (Південна Корея) у 5-ти біологічних пробах.

Аналіз даних за результатами біохімічного профілювання методом головних компонент виконували у програмі Statistica 7.0.

Результати дослідження та їх обговорення. В агроценозах Київської області було відібрано зразки квасолі з характерними симптомами вірусного ураження так і без симптомів (Рис. 1, 2). Для дослідження на наявність вірусів, окрім того було відібрано листки нижніх та верхніх ярусів рослин квасолі для більш точної вибірки та ідентифікації вірусів.

Рис. 1. Листки квасолі звичайної з симптомами ураження вірусом жовтої мозаїки квасолі

Рис. 2. Листки квасолі звичайної з симптомами ураження вірусом звичайної мозаїки квасолі

Рис. 3. BYMV: 1-26В, 2-26Н, 3-27В, 4-27Н, 5-28В, 6-28Н; BCMV: 1-26В, 2-26Н, 3-27В, 4-27Н, 5-28В, 6-28Н, М – маркер довжин ДНК фрагментів (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder SM0322)

Рис.4. SMV: 1-26В, 2-26Н, 3-27В, 4-27Н, 5-28В, 6-28Н, М – маркер довжин ДНК фрагментів (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder SM0322)

Було проведено скринінг зразків SMV. Результати ПЛР діагностики квасолі на наявність BCMV, BYMV, наведені в таблиці 1.

2. Результати ПЛР діагностики

№ зразка рослини	BCMV	BYMV	SMV	№ зразка рослини	BCMV	BYMV	SMV
1		+		26В	+	+	
2		+		26Н	+		
3		+		27В	+		+
4		+		27Н	+	+	+
5		+		28В	+	+	
6				28Н	+	+	+
7				29В	+	+	+
8				29Н	+	+	+
9				30В	+	+	+
10				30Н	+		+
11				31Н	+		+
12				32В	+	+	
13				32Н	+		+
14		+		33			
15				34	+		
16		+		35	+		+
17		+		36			
18				37			
19		+		38			
20		+	+	39			
21		+		40			
22		+		41	+	+	+
23		+		45			
24		+	+	47			
25			+				

*В-верхній листок, Н-нижній листок

Гринчук К.В.

У даний час відомо, що на якісний склад і концентрацію вторинних метаболітів рослин впливають різні чинники: умови зростання, фаза розвитку, вік, пряму дію фітофагів, патогенних мікроорганізмів і вірусів. У стресових умовах у рослин збільшуються навантаження на внутрішньоклітинні структури (мембрани, білки, біополімери), що пов'язані з окислювальними процесами, які посилюються при захисних реакціях.

Симптоми вірусної хвороби квасолі були частково покладені в основу назви вірусів. Перш за все, це поява хлоротичних порушень в пігментації листків. У разі високого вірусного навантаження на рослинний організм, такі зміни є діагностичними і для більшості сприйнятливих до них видів рослин носять обов'язковий характер. При цьому рисунок хлоротичних змін листової пластинки, викликаних вірусами, також має специфічний характер.

Депігментація листків на тканинному і клітинному рівнях обумовлена змінами в кількісному і

якісному складі пігментів комплексу. Різні пігменти активно поглинають електромагнітну енергію і мають індивідуальні смуги максимальної абсорбції, що дозволяє відрізнити по ним основні класи пігментів (каротиноїди, хлорофіли та їх похідні, пігменти фенольної природи) [7, 8]. Проведення спектрофотометричного аналізу екстрактів листків показало, що профілі спектрів поглинання у здорових та інфікованих ВУМВ рослин відрізняються вже тоді, коли візуально розрізнити симптоми ще складно, однак наявність вірусного РНК підтверджується ПЛР (рис. 5). Було встановлено, що ВУМВ викликає загальне зниження концентрації хлорофілів і каротиноїдів, при цьому вміст останніх відбувається більш динамічно (рис. 5, в-г). Змінюється профіль в УВ спектрі, що пов'язано з якісною перебудовою у компонентному складі фенолів, інтенсивно поглинають електромагнітну енергію в цьому діапазоні (рис. 5, а-б).

Гринчук К.В.

Рис. 5. Спектральні характеристики поглинання електромагнітної енергії метанольними екстрактами листків квасолі на різній стадії вірусної інфекції. а, в - первинні симптоми, б, г - виражені симптоми

За вірусної деструкції пігментного комплексу в листках значно знижується вміст хлорофілів і каротиноїдів. При цьому на спектрах не виявляються піки з максимумами поглинання в області 436-438 нм, проте зберігаються пігменти з максимум поглинання в області 468 нм. В УФ діапазоні за розвитку вірусного захворювання рисунок профілю на тлі деякого зниження інтенсивності поглинання залишається без видимих змін. У цій області найбільш активні продукти фенілпропаноїдного синтезу.

Фенольні речовини виконують різні функції в рослинному організмі. У зв'язку з цим практичний інтерес представляють процеси зміни складу

фенольних комплексів в рослинних тканинах в результаті вірусної інфекції, у тому числі і змішаного типу. Перші візуальні діагностичні ознаки дослідження показують, що в зразках листків квасолі одного і того ж сорту, інфікованих BCMV і BYMV, якісний склад фенольних сполук різний. Однак при цьому слід враховувати, що хімічний склад фенольного комплексу одного і того ж сорту може дещо змінюватися в залежності від умов зростання і фази розвитку рослини. Порівняльний аналіз біохімічних профілів листків методом головних компонент дозволив виділити фенольні продукти, найбільш пов'язаних з вірусним навантаженням (табл. 3).

Гринчук К.В.

3. Внески індивідуальних сполук в головні компоненти (PC), що оснований на кореляції

R _f 100	PC 1	PC 2	PC 3	Маркер за станом рослини
12	0,521	0,038	4,280	-
17	1,785	0,052	5,329	-
26	1,775	0,065	4,659	-
33	5,657	20,562	15,747	-
41	31,381	0,030	2,282	ЗМІ*
51	9,388	0,002	0,623	ЗМІ
53	1,658	0,051	5,163	-
55	1,865	0,092	4,992	-
69	5,791	19,903	16,427	-
70	1,777	0,052	5,274	-
74	31,627	0,087	2,281	ЗМІ
82	4,977	58,977	28,054	ЗД
93	1,797	0,090	4,888	-

Примітка: * ЗМІ – змішана вірусна інфекція, ЗД – здорова рослина

Показано, що індуковане змішаної вірусної інфекції. У вірусами накопичення окремих здорових рослин потенційним фенольних продуктів ($R_f = 0,41; 0,51; 0,74$), було більш вираженим в умовах з $R_f = 0,82$ (рис. 6).

Рис. 6. Результати аналізу головних компонент на основі біохімічних фенольних сполук у листках здорових та інфікованих вірусами рослин квасолі звичайної

Таким чином, в аспекті впливу на рослину вірусної хвороби, серед виявлених в біохімічних профілях фенольних речовин виділяється три групи сполук: 1 – потенційні маркери змішаної вірусної інфекції BCMV і BYMV (позначені червоним кольором на графіку), 2 – потенційний маркер відсутності вірусів або наявності патогенів в латентній формі; 3 – конситутивні фенольні сполуки, наявність яких в листках не має прямого зв'язку з вірусними патогенами. Дана класифікація фенольних речовин може розглядатися для вивчення потенціальної стійкості сортів квасолі до вірусів, а також у вивченні фізіології захисних реакцій рослин в умовах вірусного патогенезу, у тому числі змішаного характеру.

Висновки і перспективи. При ураженні рослин квасолі BCMV і

BYMV фізіологічні зміни відбуваються задовго до появи первинних візуальних діагностичних ознак. Початкові стадії вірусної інфекції супроводжуються зниженням вмісту в листках каротиноїдів і хлорофілів, а також якісною зміною в складі продуктів фенілпропаноїдного синтезу. До того ж нами було ідентифіковано одночасно присутність окрім BCMV та BYMV, SCV, який уражує квасолу переважно в умовах змішаної інфекції. Найбільш виражені фізіологічні зміни виявлені в листках рослин в умовах змішаної вірусної інфекції, обумовленої BCMV і BYMV. У листках квасолі виділено три групи фенольних речовин, серед яких сполуки – маркери змішаної вірусної інфекції, викликані BCMV і BYMV, маркер відсутності вірусної інфекції і група речовин, які не мають

Гринчук К.В.
вираженого зв'язку з вірусним
навантаженням.

References

1. Andreyeva V.A. (1988) *Ferment peroksidaza: uchastiye v zashchitnom mekhanizme rasteniy*. Moskva [in Russian].
2. Antipov I.O. (2014) PCR diagnostic of the bean yellow mosaic virus *Nauchnyy vestnik Natsional'nogo universiteta bioresursov i prirodopol'zovaniya Ukrainy. Seriya: Biologiya, biotekhnologiya, ekologiya*. 204 P. 151-154 [in Ukrainian].
3. Antipov, I., Hrynychuk, K., Duplyak, O. (2016). Rozrobka PLR-system dlya identyfikatsiyi virusu zvychnoyi mozayiky kvasoli [Development PCR systems for identification of mosaic virus ordinary beans (Bean common mosaic virus)]. *Naukovyy visnyk NUBIP Ukrayiny – Scientific herald of NULES of Ukraine*, 234, 40–46 [in Ukrainian].
4. Antipov, I., Hrynychuk, K., Sidorenko, O.P. (2014). PLR diagnostyka ta identyfikatsiia virusu zhovtoi mozaiky kvasoli (Bean yellow mosaic virus) [PCR diagnosis and identification of the Bean yellow mosaic virus] '14: V *Vseukrainska naukovo-praktychna konferentsiia molodykh uchenykh i studentiv — 5th All-Ukrainian scientific conference of young scientists and students* (pp. 22–23). Kyiv [in Ukrainian].
5. Dyxon R.A. Palva N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant cell*. №7. P. 1085-1097 [in English].
6. Hammond-Kosack K.E, Gones JDG (1996) Resistance gene dependent plant

defence responses. *Plant Cell*. №8. P. 1773-1791 [in English].

7. Hill J. H. Soybean mosaic virus (1999) In Hartman G.L., Sinclair J.B., Ruge J.C., *Compendium of soybean diseases, 4th ed. American Phytopathological Society, St. Paul, M.N.* P. 70-71 [in English].

8. Hull R. (2001) Matthews' plant virology, 4th ed. San Diego, CA. *Academic Press*. 1001 p. [in English].

9. Kyle M.M, Provvidenti R. (1993) Inheritance of resistance to potyviruses in *Phaseolus vulgaris* L. II. Linkage relations and utility of a dominant gene for lethal systemic necrosis to soybean mosaic virus. *Theor Appl Genet*. Vol.86 (2-3). P. 189-96 [in English].

10. Mauch-Mani B. Metraux J.P. (1998) Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals Bot*. №82. P. 535-540 [in English].

11. Murphy A.M., Chivasa S., Singh D.P., Carr J. (1999) Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trend Plant Sci*. №4. P. 155-160 [in English].

12. Shakirova F.M. (2001) *Nespetsificheskaya ustoychivost' rasteniy k stressovym faktoram i yeye regulyatsiya*. – Ufa, 2001 [in English].

13. Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., Liu, Y. (2016) Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Front Microbiol*, 7 [in English].

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ Е. В. Гринчук

Анотация. При заражении растений вирусами физиологические изменения происходят к появлению первичных визуальных диагностических признаков. Исследована растения фасоли на наличие вирусной инфекции и установлено присутствие смешанной инфекции. Показано, что начальные стадии вирусной инфекции сопровождаются снижением содержания в листьях каротиноидов и хлорофиллов, а также качественным изменением в составе продуктов фенилпропаноидного синтеза. Таким образом в листьях фасоли выделено три

Гринчук К.В.

группы фенольных веществ, среди которых соединения - маркеры смешанной вирусной инфекции, вызванной вирусом обычной мозаики фасоли и вирусом желтой мозаики фасоли, маркер отсутствия вирусной инфекции и группа веществ, которые не имеют выраженной связи с вирусной нагрузкой. Также следует отметить, что вирус мозаики сои был идентифицирован в условиях смешанной инфекции, в присутствии вируса обычной мозаики фасоли и вируса желтой мозаики фасоли. Таким образом, нами выявлено потенциальные биохимические маркеры вирусной инфекции в листьях фасоли обыкновенной.

Ключевые слова: *фасоль, вирус обычной мозаики, вирус желтой мозаики фасоли, фенольные вещества, флавоноиды*

RESEARCHING OF PHENOLIC SUBSTANCES AS POTENTIAL MARKERS OF VIRAL DISEASES OF COMMON BEAN

K. Hrynychuk

Abstract. *In viruses infected plants, physiological changes occur before the appearance of primary visual diagnostic features. Bean plants were investigated for the presence of viral infection and the presence of mixed infection was established. It is shown that the initial stages of viral infection are accompanied by a decrease in the content of carotenoids and chlorophyll leaves, as well as a qualitative change in the composition of phenylpropanoid synthesis products. Thus, three groups of phenolic substances are identified in the bean leaves, among which compounds are markers of mixed viral infection caused by common bean mosaic virus and bean yellow mosaic virus, a marker of no viral infection, and a group of substances that do not have a pronounced viral load. Bean common mosaic virus was identified by the presence of bean common mosaic viruses and bean yellow mosaic viruses. Therefore, we have identified potential biochemical markers of viral infection in common bean leaves.*

Keywords: *beans, bean mosaic virus, bean yellow mosaic virus, phenolic compounds, flavonoids*