УДК 578.4:578.27/576.385
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/13082

ПАТОГЕНЕЗ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ ЗА УМОВ ЗМІШАНОЇ ІНФЕКЦІЇ

К. В. ГРИНЧУК, *кандидат біологічних наук, кафедра молекулярної біології, мікробіології та біобезпеки*
Національний університет біоресурсів і природокористування України
E-mail: blackgrampus@ukr.net

Анотація. *Показано, що за умов інфікування цукрових буряків вірусом некротичного пожовтіння жилок буряка, у клітинах флоеми провідних пучків листків уміст пероксидаз, що пов'язані із клітинними стінками, зменшується на фоні нагромадження вільних ізоферментів у протопластах ситоподібних трубок і клітин-супутниць. Перерозподіл молекул пероксидази в компартментах клітин супроводжується значним підвищенням їхньої активності. За змішаної інфекції у паренхімі коренеплодів цукрових буряків також виявлено специфічні середньополярні терпеноїдні сполуки, які є потенційними біохімічними маркерами вірусного патогенезу.*

Ключові слова: *вірус некротичного пожовтіння жилок буряка, вірус мозаїки буряка, вірус жовтяниці буряка, полімеразна ланцюгова реакція, патогенез, пероксидаза*

Актуальність.

Цукрові буряки схильні до різноманітних захворювань. Усе більшої актуальності набуває боротьба з хворобами листків для розроблення ефективних систем захисту. До того ж на цукрових буряках досить часто трапляються змішані інфекції, як вірусні, так і грибні захворювання. Хвороби листкового апарату, що викликаються патогенними грибами роду *Alternaria*, значно знижують якість коренеплодів, а відповідно і врожай. На території України основними небезпечними патогенами є вірусні інфекції, що спричиняють виникнення мозаїки та жовтяниці. Найбільш розповсюдженими збудниками цих захворювань є вірус мозаїки (Beet mosaic virus) та вірус жовтяниці буряків (Beet yellows virus) [3, 7, 9, 10]. Вірус некротичного пожовтіння жилок буряка (ВНПЖБ) є збудником вірусної хвороби ризоманія, яка завдає значних негативних наслідків за вирощування цукрових буряків і є найбільш поширеною вірусною хворобою даної культури. Передача вірусу відбувається плазмодіофороміцетом Polymyxa betae, це дозволяє вірусу виживати десятиліттями на забруднених ґрунтах. Ризоманія одна з найбільш поширених хвороб цукрового буряка у світі і є карантинним об’єктом [6, 7, 9].

Важливе значення має вивчення патогенезу рослин за наявності змішаної інфекції та дослідження реакцій рослин для подальшого дослідження вірусів буряків і розроблення ефективних технологій та шляхів попередження виникнення й розповсюдження епіфітотій.

Мета дослідження – дослідити патогенез цукрових буряків за умов змішаної інфекції з можливістю її ідентифікації за біохімічними маркерами.

Матеріали і методи дослідження.

Матеріалом для дослідження слугували листки та коренеплоди рослин цукрових буряків із чіткими симптомами та без симптомів вірусного ураження, які відбирали в польових умовах під час вегетації.

Для виявлення одночасно декількох вірусів цукрових буряків, а саме: ВНПЖБ, ВМБ, ВЖБ, було проведено ПЛР-аналіз, використовуючи пари праймерів: BNYVV1 5'-ttcggacgtcgtgagtgtta-3', BNYVV2 5'-cccgagtccacattaattcc-3' з розміром продукту ампліфікації 419 п. н.; BtMV-1 5'-ggccatacatgcctcgttat-3', BtMV-2 3'-gtgagcgttgacatctgtgg-5' – 239 п. н. [2] та BYV-1 5'-tcgcgttaggactttgtttg-3', BYV-2 3'-gtgtgagtggcgttttcg-5' – 392 п. н. [1]. ПЛР здійснювали за наступних параметрів: початкову денатурацію кДНК проводили за температури 94 °С упродовж 5 хв; денатурацію кДНК 94 °С – 30 с, відпал праймерів 60 °С – 30 с, елонгацію 72 °С – 30 с; кінцеву елонгацію 72 °С – 7 хв. Кількість циклів становила 30 [5].

Дослідження локалізації і активності пероксидаз у тканинах цукрових буряків.

Локалізацію пероксидази визначали стандартними гістохімічними методами. Зрізи тканин листкових пластинок цукрових буряків поміщали в суміш перекис бензидину (750 мг + 0,7 мл 3 % H_2O_2, попередньо розчиненої в 500 мл 40 % етилового спирту) на 30 с за кімнатної температури, після чого промивали 40 % спиртовим розчином [4, 11, 12]. Отримані нативні препарати вивчали за допомогою мікроскопу Nikon Eclipse E-200. Фотодокументацію отриманих даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Camera Control Pro 2.

Активність пероксидази визначали спектрофотометричним методом за Бояркіним. Метод ґрунтується на визначенні швидкості реакції окислення бензидину до утворення синього продукту його окиснювання в присутності перекису водню й пероксидази.

Наважку рослинного матеріалу (листків, коренеплодів) цукрових буряків масою 200–300 мг гомогенізували в холодному ацетатному буфері (pH 5,0), до якого додавали фенілметилсульфонілфторид (ФМСФ) із розрахунку 20 мкл 100 мМ розчину ФМСФ на 2 мл буферу. Гомогенат витримували на холоді 10 хв і центрифугували (5 хв, 6 тис об/хв). Для вимірювань використовували стандартні кварцові кювети (10 м).

Реакційна суміш складалась із послідовного додавання: 500 мкл витяжки, 500 мкл 0,2 М Na-ацетатного буфера (pH 5,0), 500 мкл 0,01 % розчину солянокислого бензидину і 500 мкл 0,3 % перекису водню. У контрольну кювету замість екстракту вносили 500 мкл 0,2 М Na-ацетатного буфера. Вимір оптичної густини проводили щосекунди впродовж 120 с за довжини хвилі 590 нм [4].

Активність пероксидази у відносних одиницях на 1 г сирої ваги розраховували за формулою:

$A = (\Delta D \times V \times X) / (T \times L \times m)$,

де A – активність ферменту;

ΔD – зміна оптичної густини;

V – загальний об'єм отриманої витяжки, мл;

X – кінцеве розведення витяжки в кюветі;

T – час реакції (с);

L – товщина шару, см, m – маса наважки, г.

Визначення активності вільних і слабкозв'язаних пероксидаз проводили в трьох повторностях.

Визначення вмісту фенольних сполук.

Уміст розчинних поліфенолів визначали за методом Folin Ciocoalteu в модифікації Singleton Rossi, який базується на реакції фенолів із реактивом Фоліна-Чокальтеу. Реактив складається із суміші фосфорно-вольфрамової й фосфорно-молібденової кислот, які відновлюються за реакції окиснювання фенолів до суміші оксидів. Водночас утворюється блакитне забарвлення суміші, яке пропорційне кількості фенольних речовин. Сумарний уміст фенольних сполук визначали в метанольних екстрактах (MeOH – 100 %) із листків і коренеплодів цукрових буряків із використанням стандартних кювет (10 мм) на скануючому спектрофотометрі Optizen Pop (Південна Корея). Калібрувальний графік будували за галовою кислотою. Для визначення концентрації фенолів у тканинах рослин цукрових буряків до 100 мкл екстракту послідовно додавали 400 мкл етилового спирту, 2,5 мл реактиву Фоліна-Чокальтеу, який розводили дистильованою водою (1 : 10). У контрольні пробірки додавали 0,5 мл 80 % етанолу. До отриманої суміші через 3 хв додавали 2 мл водного розчину Na2CO3 (75 г/л). Пробірки із сумішшю змішували і залишали на 2 год. Вимірювання оптичної густини проводили за довжини хвилі 765 нм.

Уміст внутрішньоклітинних фенольних сполук у зразках розраховували за формулою:

$Ф = (C \times V \text{ екстракту}) / (m \times 1000)$,

де Ф – загальний вміст внутрішньоклітинних фенольних сполук, $мг \cdot г^{-1}$;

C – концентрація фенольних сполук, л;

V екстракту – загальний об'єм екстракту, мл;

m – маса наважки, г;

1000 – коефіцієнт переведення л в мл (об'єму екстракту).

Кількісний вміст флавоноїдів визначали в метанольних екстрактах при $\lambda = 419$ нм. До 300 мкл екстракту послідовно додавали 200 мкл 0,1 М розчину хлориду алюмінію ($AlCl_3$) і 300 мкл 1 М ацетату натрію (CH_3COONa). Як стандарт використовували кверцетин (Sigma, Німеччина) [8]. Повторність фітохімічних досліджень п'ятиразова.

Фітохімічне профілювання вторинних метаболітів листків цукрових буряків.

Фітохімічне профілювання листків рослин виконували методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках сілікагель 60 (Sorbfil F_{254}) і високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ, Merck). Розділення терпенових сполук і сапонінів проводили в системі розчинників: хлороформ – оцтова кислота – метанол – вода (v/v/v/v – 60/32/12/8). Для виявлення індивідуальних сполук та їхньої хімічної природи хроматограми обробляли розчином анісового альдегіду.

Статистична обробка даних.

Рослинні тканини досліджували на мікроскопі Nikon Eclipse E-200 (Japan). Фотодокументацію й опрацювання отриманих даних гістохімічного аналізу виконували в спеціалізованій програмі для аналізу цифрових зображень Image-Pro Premier 9.0 (USA). Показники Rf індивідуальних сполук визначали фотоденситометрично з використанням комп'ютерної програми Sorbfil TLC. Статистичну обробку даних виконували за допомогою програми Statistica 7.0 (USA). Регресійний аналіз проводили у програмі Sigma Plot 12.0 (USA). Достовірність відмінностей середніх визначали за найменшою істотною різницею (НІР) за $p > 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

За умов змішаної вірусно-грибної інфекції в рослин цукрових буряків виявлялися типові симптоми патогенезу: пожовтіння центральної й бічних жилок з адаксиальної поверхні листків, порушення геометрії метамерів (збільшення індексу співвідношення довжини до ширини листкових пластинок, їхня асиметричність, порушення типової форми тощо), мозаїчна депігментація, некротичні плями й перфорації, які утворювалися на завершальних стадіях реакції надчутливості рослини (РНР).

Наявність у тканинах листка гіф фітопатогенних грибів, зокрема *Alternaria tenuissima*, супроводжувалася характерним протеолітичним руйнуванням клітинних стінок, особливо інтенсивно деструкція тканин спостерігалась у провідних пучках черешків листків. Гіфи виявлялись у судинах ксилеми й за характером їх просторової орієнтації на серії зрізів, очевидно, що гриби поширюються в тканинах листа переважно провідними пучками. Показано також, що за грибних уражень покривних тканин черешка в клітинах інтенсивно розвивається реакція надчутливості рослин, яка супроводжується лігнінофікацією і опробковінням клітинних стінок основної паренхіми (рис. 1).

Із 21 зразка відібраних рослин цукрових буряків установлено наявність ВНПЖБ у зразках під номерами 1, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 16, 17, 18, 20, 21 (рис. 2).

Рослини цукрових буряків під номерами 18, 19, 20, 21 були обрані для проведення ПЛР-аналізу коренеплодів, а саме, кДНК була отримана із тканин провідних пучків коренеплодів і встановлено наявність ВНПЖБ у зразку під номером 18, а ВМБ був присутній у зразках 18, 20, 21. У зразках під номерами 4, 17, 18, 20, 21 було встановлено присутність змішаної інфекції, а саме ВНПЖБ та ВМБ. ВЖБ в аналізованих зразках був відсутній (рис. 3).

У листкових пластинках запрограмована клітинна смерть (ЗКС) має певні специфічні ознаки, що пов'язані з особливостями анатомічної будови і просторового розподілу метаболітів. Листкова пластинка цукрового буряка уніфаціального типу. Клітини верхнього епідермісу дещо крупніші за нижній епідерміс. Втім, виражених мікроморфологічних відмінностей у структурі мезофілу адаксиальної й абаксиальної поверхні не виявляється. У зовнішніх клітинних стінках верхнього й нижнього епідермісу безвірусного листка виявлено порівняльно високий уміст аніонних пероксидаз (рис. 1, а), які є активним складником неспецифічного імунітету рослин. У тканинах листків цукро-

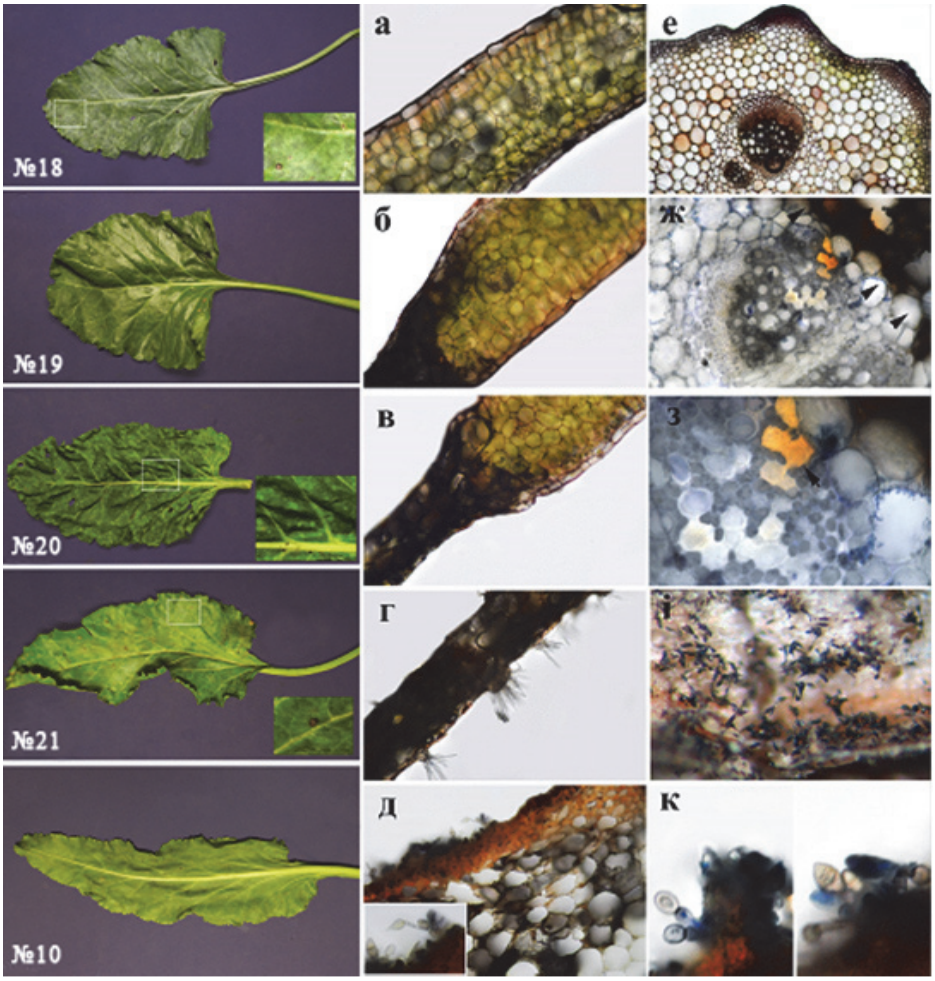

Рис. 1 Трансформація тканин листків цукрових буряків в умовах змішаної інфекції: № 18, 20, 21, 10 – листки, в яких виявлено віруси ВНПЖБ і ВМБ; № 19 – листок в якому не виявлено вірусів; № 18, 21 – листки рослин, що уражені грибами; анатомічна будова листків цукрових буряків з ознаками ушкоджень тканин: а – будова листка без симптомів патогенезу; б, в – реакція надчутливості рослин, яка викликана фітопатогенними грибами; г – ознаки ураження грибами; д – реакція надчутливості рослин, яка викликана альтернаріозом, з опробковінням коленхіми, облітерацією клітин паренхіми кори; д, к – спороношення Alternaria tenuissima; е – фрагмент поперечного зрізу центральної жилки листка безсимптомної рослини; ж, з – лізис клітинних стінок клітин ксилеми під впливом екзоферментів грибів; і – спори альтернарії на поверхні центральної жилки листка

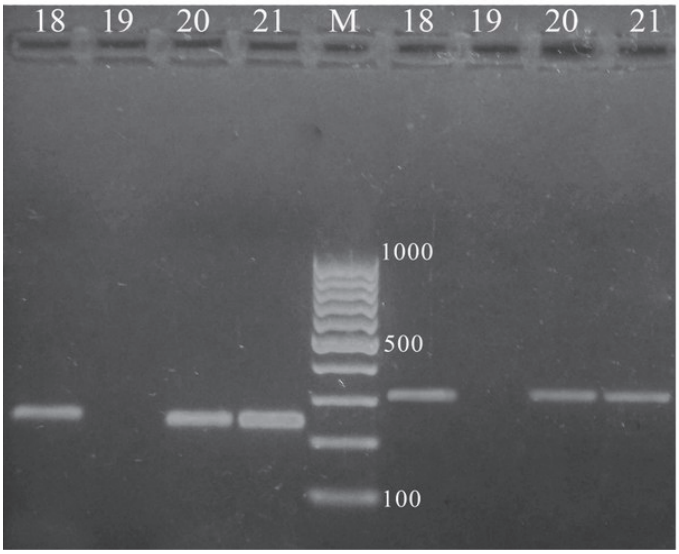

Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу визначення ВНПЖБ, ВМБ, ВЖБ у зразках листків цукрових буряків: M (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів).

вих буряків, де нами виявлено віруси ВНПЖБ і ВМБ вміст зв'язаних із клітинними стінками пероксидаз візуально був значно меншим (рис. 1, б).

Пероксидаза є поліфункціональним ферментом. Важливим процесом, який пов'язаний із каталітичним розкладенням перекису водню, є процес окислення поліфенольних сполук, після чого вони набувають нових властивостей, зазвичай токсичних щодо клітин потенційних патогенних організмів.

Інтенсивність і характер поширення РНР тканинами листка також виявляли тісний зв'язок з активністю аніонних пероксидаз. Реакція надчутливості активніше поширювалась у морфологічно нижньому мезофілі. За даними гістохімічного аналізу було з'ясовано, що пожовтіння жилок листків цукрових буряків пов'язаний з інтенсивною лігнінофікацією й суберинізацією клітин коленхіми й частково основної паренхіми. Значні відкладення біополімерів на поверхні змінюють світлопоглинальні властивості тканин, які зумовлюють їхній колір.

Детальний гістохімічний аналіз провідних пучків жилок листків показав, що в безсимптомних рослин до основної фракції пероксидаз належать аніонні форми ферментів, зв'язані з клітинними стінками. Значна їхня кількість виявлена в зоні диференціації трахеальних елементів метаксилеми. У цілком сформованих клітинах провідної системи пероксидаза не виявляється. У жилках більшості безсимптомних рослин, у яких за використання ПЛР-діагностикумів досліджувані віруси не виявлено, у клітинах основної паренхіми спорадично формуються окремі клітини з високим вмістом пероксисом. Останні є важливим ланцюгом кисневого метаболізму клітини й пероксидзалежних процесів у клітині.

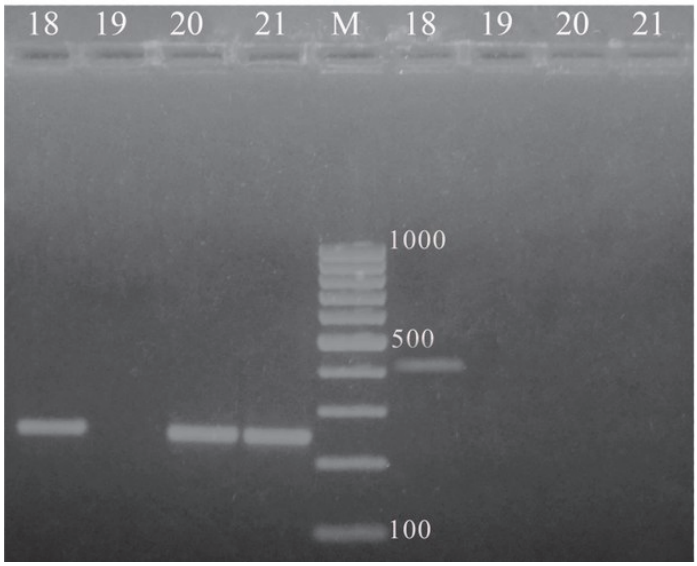

Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР-аналізу визначення ВНПЖБ, ВМБ, ВЖБ у зразках коренеплодів цукрового буряка: M (O'GeneRuler™ DNALadder, #SM 0241) – маркер довжин фрагментів (пар нуклеотидів)

За реакцією окиснення бензидину такі клітини на зрізах виділялися значною інтенсивністю забарвлення (рис. 4). Захисні реакції рослин проти фітопатогенів супроводжувались активацією вільних і слабкозв'язаних аніонних і катіонно-аніонних пероксидаз, які беруть участь у розвитку реакцій індукованого неспецифічного імунітету, формуванні тканинних бар'єрів через полімеризацію фенольних сполук і лігнінофікацію клітинних стінок. У провідних пучках листків фермент нагромаджувався в матриксі клітинних стінок ендокортексу, а також камбіальних клітин відкритих колатеральних пучків. Розвиток патогенної трансформації тканини супроводжувався вивільненням пероксидази, яка розподілялася дифузно протопластами клітин флоеми, а також активно нагромаджувалася в клітинних стінках обкладинки провідних пучків.

Активність пероксидази коренеплодів цукрових буряків за умов змішаної інфекції також мала прямий зв'язок зі ступенем ураження тканин. Виділені слабкозв'язані з клітинними стінками і вільні аніонні пероксидази характеризувалися високою активністю в рослин зі змішаною вірусною і вірусно-грибною інфекціями.

Кінетика ферментативного процесу окислення бензидину продуктами розкладання перекису водню описувалася рівнянням:

$$y = \frac{B_{\max} \times x}{K_d + x},$$

де y – оптична густина; B_{max} – межа насиченості логісти; K_d – час, в який швидкість ферментативної реакції складає половину від максимальної; x – час протікання ферментативного процесу.

Визначені коефіцієнти рівнянь характеризують пероксидазну систему ко-

ренеплодів цукрових буряків (табл. 1). Так, за умов інфікування рослин цукрових буряків лише ВНПЖБ у екстрактах коренеплодів показник B_{max}, який прямо пов'язаний із концентрацією й активністю пероксидази в екстракті, був максимальним. Порівнюючи з контролем даний коефіцієнт був у 2,74 рази більшим.

Рослини зі змішаною інфекцією, а саме ВНПЖБ і ВМБ, також характеризувалися підвищеним значення коефіцієнту, втім, його значення було майже вдвічі нижчим, ніж у рослин, які виявили позитивний результат ПЛР-аналізу лише на ВНПЖБ (табл. 1).

Важливим показником кінетики ферментативного каталізу є швидкість досягнення системою найвищої швидкості. За даним показником максимальної швидкості реакції до-

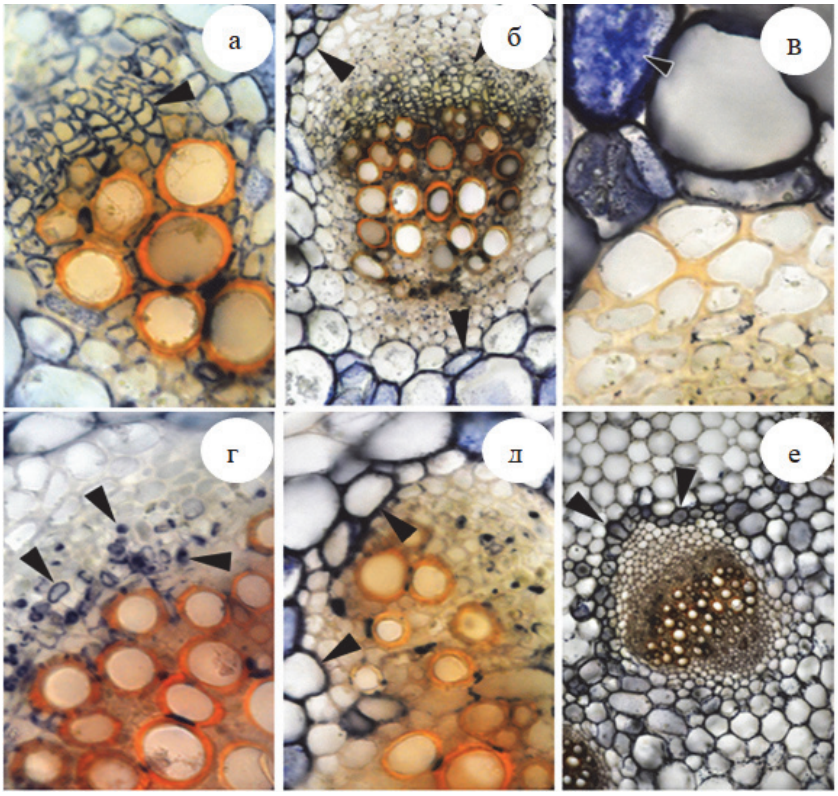

Рис. 4. Локалізація пероксидази в тканинах провідних пучків і паренхіми центральних жилок листків безсимптомних (а-в) і інфікованих (г-е) рослин цукрових буряків: а, б – провідний пучок у якому пероксидаза виявляється у клітинних стінках флоеми і в паренхімі, що його оточує (стрілками позначено локалізацію пероксидази); в – клітина паренхіми кори з високим вмістом ферменту; г – фрагмент провідного пучка (стрілками позначено підвищений вміст пероксидаз у ситоподібних трубках); д – підвищена активність пероксидази, яка зв'язана з клітинними стінками паренхіми (стрілками позначено перкосидазу, що зв'язана з клітинними стінками); е – локалізація пероксидази в клітинних стінках перициклу

Таблиця 1. **Коефіцієнти рівняння кінетики окислення бензидину в процесі розкладання перекису водню пероксидазою коренеплодів цукрових буряків**

Зразок, №	Вірус	Коефіцієнти		
		B_{max}	K_d	R^2
18	ВНПЖБ, ВМБ	2,9057	29,6947	0,991
19	-	1,2157	31,5741	0,991
20	ВНПЖБ, ВМБ	1,7020	32,5833	0,994
21	ВНПЖБ, ВМБ	2,0426	32,4554	0,997
10	ВНПЖБ	3,3205	15,8687	0,973

сягали також рослини, які інфіковані виключно ВНПЖБ (рис. 5).

Дослідження загального вмісту фенольних сполук показало, що за ознаками ураження рослин грибами, на фоні вірусних інфекцій, спостерігалася значна перебудова процесів вторинного метаболізму. Інфекційні процеси супроводжувались активацією фенілпропаноїдного синтезу, унаслідок якого майже в 1,5-2 рази підвищувався вміст фенолів (табл. 2).

Уміст флавоноїдів у інфікованих рослин, навпаки, дещо зменшувався. Виявлена особливість, можливо, пов'язана з індукованою фітопатогенами фізіологічною перебудовою рослинного організму. Вона, ймовірно, пов'язана з частковою дерегуляцією біоорганічного синтезу, у якому активність ферментів фенілпропаноїдного синтезу (у тому числі фенілаланін-аміак-ліази) зростає, а халконсинтази спадає. Зменшення загального пулу флавоноїдів ослаблює регуляторні можливості рослинного організму, певна їхня частина вступає в реакції нейтралізації вільних радикалів і захищає фосфоліпіди мембран від окислення. Отже, індекс співвідношення загального вмісту фенольних сполук до флавоноїдів є високоінформативним показником загального стану рослини, органу або тканини і їхньої здатності до активного захисту проти стресових чинників, у тому числі викликаних інфекцією.

Окрім фенольних сполук важливе місце у формуванні системи захисту рослини займають терпеноїди й сапоніни. Під час біохімічного профі-

Таблиця 2. **Вміст фенольних сполук у листках цукрових буряків у нормі та за умов змішаної інфекції (n = 4, x ± SE)**

Зразок	Вірус	Фн, мг/г	$НІР_{05}$	Фл, мг/г	$НІР_{05}$	Фн/Фл
№18	ВНПЖБ, ВМБ	52,6 ± 2,10	7,88	8,6 ± 0,32	1,78	6,1 ± 0,21
№19	-	34,1 ± 1,31	-	11,2 ± 0,46	-	3,1 ± 0,13
№20	ВНПЖБ, ВМБ	60,7 ± 2,35	8,56	9,2 ± 0,32	1,78	6,6 ± 0,22
№21	ВНПЖБ, ВМБ	40,4 ± 1,56	6,48	7,4 ± 0,27	1,70	5,5 ± 0,19
№10	ВНПЖБ	41,6 ± 1,62	6,63	9,5 ± 0,35	1,84	4,4 ± 0,14

Примітка: Фн – Феноли, Фл – флавоноїда, НІР05 – найменша істотна різниця

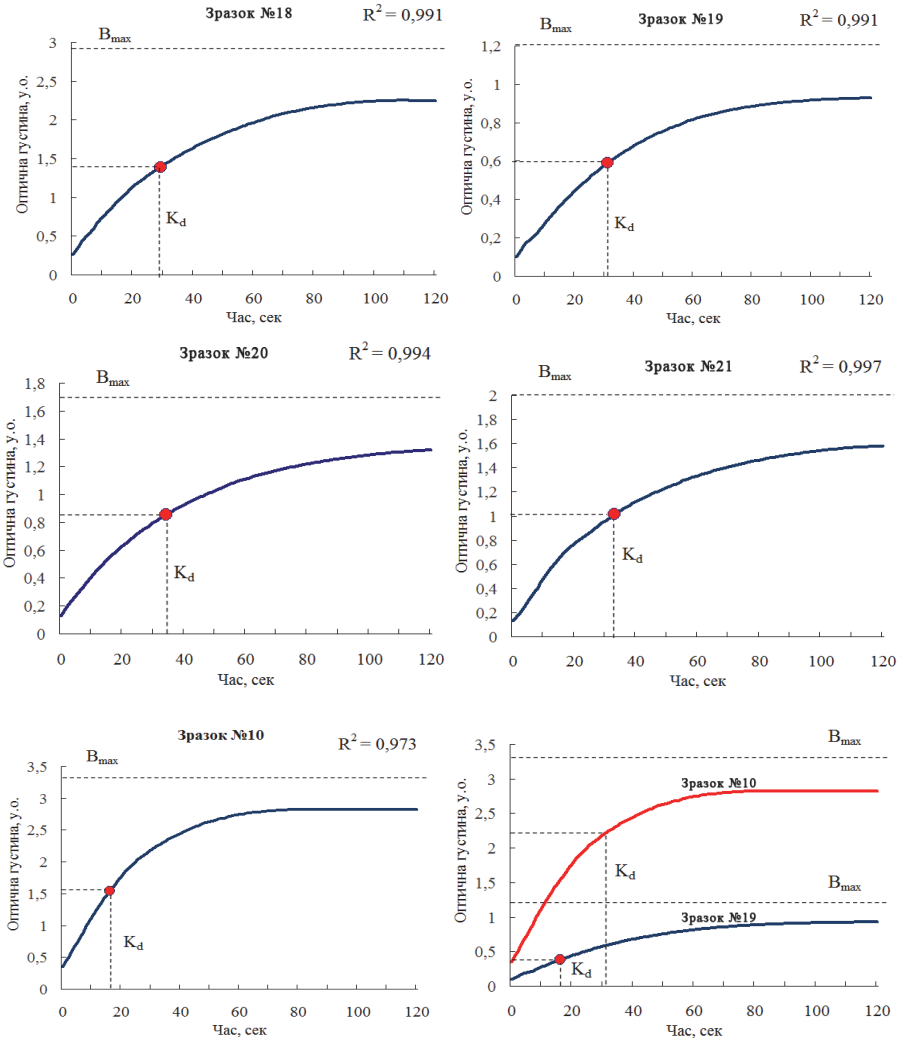

Рис. 5. Кінетика окиснення бензидину продуктами пероксидазного розкладання перекису водню: зразки № 10, 18, 20, 21; порівняльний графік безсимптомної (№ 19) і вірусінфікованої (№ 10) рослини

лювання нам вдалося встановити, що під дією фітопатогенів у запасаючих тканинах коренеплодів цукрових буряків виявляються специфічні середньополярні сполуки (рис. 6).

У безсимптомних рослин виділені речовини не накопичувались. Отже, дані вторинні метаболіти, ймовірно, системно пов'язані з патогенезом і потенційно є біохімічними маркерами інфекційних процесів у рослинному організмі. За результатами фотоденситометричного аналізу встановлено, що найактивніше терпеноїдні сполуки (Rf ~ 0,17–0,27) синтезуються в коренеплодах за ураження запасаючих тканин грибами.

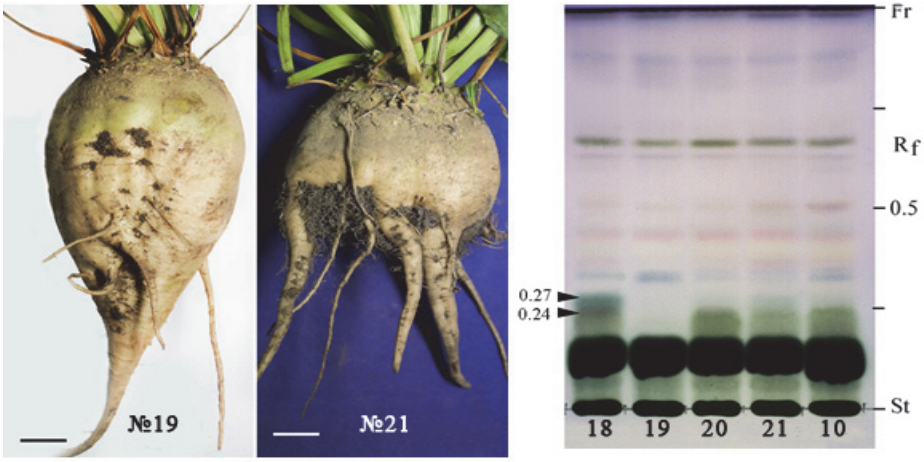

Рис. 6. Біохімічне профілювання екстрактів коренеплодів цукрових буряків за умов змішаної інфекції: № 18 – рослина, що уражена грибом Alternaria tenuissima, ВНПЖБ та ВМБ; № 19 – безсимптомна рослина; № 20, 21, 10 – рослини, які уражені ВНПЖБ та ВМБ (система: хлороформ-оцтова кислота-метанол-вода, v/v/v/v – 32/12/8/4; обробка хроматограми анісовим альдегідом)

Оцінка кількісного співвідношення речовин за показниками площі піків на хроматограмі, після обробки розчином анісового альдегіду, показала, що в рослин, які були інфіковані ВНПЖБ і ВМБ (зразки № 10, 21) уміст речовини з Rf ~ 0,24 у порівнянні з рослинами, які уражені вірусно-грибною інфекцією, менший в 1,3–1,4 рази. Для коренеплодів цукрових буряків, які уражені і грибами і вірусами, найінформативнішим із визначених є метаболіт із Rf ~ 0,17, 0,27, 0,39. Певний зв'язок із відповідними реакціями рослин на присутність фітопатогенів є також сполуки з Rf ~ 0,36, 0,50. У рослин, у коренеплодах яких не виявлені вірусні і грибні патогени, дані речовини не утворювались або їхній синтез був значно уповільнений (табл. 3).

Таблиця 3. **Розподіл вторинних терпеноїдів та тритерпенових глікозидів за площами піків (S × 10^5) на фотоденситограмі**

Зразки	Площа піків за показниками Rf, S × 10^5													
	0,12	0,17	0,2	0,24	0,27	0,33	0,36	0,39	0,44	0,5	0,63	0,66	0,88	Σ
№ 18	10,3	5,8	2,7	2,7	1,7	0,41	0,23	0,14	0,43	0,44	0,41	1,52	1,06	27,87
№ 19	24,8	-	-	-	-	0,46	-	-	0,02	-	0,16	1,29	2,08	28,86
№ 20	23,1	-	4,9	-	-	0,16	-	-	0,21	-	0,13	1,58	1,54	31,66
№ 21	26,5	-	-	2,1	-	0,21	0,5	-	0,43	0,43	0,21	1,54	1,4	33,37
№ 10	31,8	-	-	1,9	-	0,75	0,88	-	0,92	0,7	0,35	1,82	2,26	41,4

За вибором системи для хроматографічного профілювання і хромогенним реактивом виявлені сполуки належать до тритерпенових сапонінів і терпеноїдів. Дані речовини характеризуються високою біологічною активністю. Тритерпенові сапоніни здатні впливати на селективність мембран, що є важливим складником системи противірусного захисту рослинних клітин. Факт наявності даних специфічних сполук у тканинах інфікованих рослин має перспективи в аспектах визначення їхньої ролі у формування конституціональної й набутої стійкості рослин, а також у якості потенційного маркеру їхньої чутливості до фітопатогенів.

Висновки і перспективи.

Встановлено, що в клітинах флоеми провідних пучків листків цукрових буряків, які інфіковані ВНПЖБ, концентрація зв'язаних із клітинними стінками пероксидаз зменшується на фоні нагромадження вільних ізоферментів у протопластах. Перерозподіл молекул пероксидази в компартментах клітин супроводжується значним підвищенням їхньої активності.

За умов змішаної інфекції в паренхімі коренеплодів цукрових буряків виявлено специфічні середньополярні речовини вторинного метаболізму, які можуть слугувати потенційними біохімічними маркерами вірусного патогенезу.

Висловлюю щиру подяку І. О. Антіпову (Національний університет біоресурсів і природокористування України) за цінні консультації та допомогу в роботі під час розробленні ПЛР систем для ідентифікації вірусів буряка та А. Ф. Ліханову (Інститут еволюційної екології НАН України) за навчання та надання допомоги під час проведення біохімічних та гістологічних досліджень.

References

1. Andrusyk, I. M., Antipov, I. O., A. M., Kyrychenko (2013) [Diagnostic and identification of beet yellows virus] Visnyk Sums'koho natsional'noho ahrarnoho universytetu, 11, 42-46. [in Ukrainian]
2. Andrusyk, I. M., Antipov, I. O., Bohach, YE. M. (2014) PCR diagnostic and identification of beet mosaic virus. Bioresursi y pryrodokorystuvannya, 5-6, 11-13 [in Ukrainian]
3. Chiba, S., Kondo, H., Miyanishi, M., Andika, I. B., Han, C., Tamada, T. (2011). The evolutionary history of Beet necrotic yellow vein virus deduced from genetic variation, geographical origin and spread, and the breaking of host resistance. Mol. Plant Microbe Interact. 24, 207–218. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0241) [in English]
4. Furst, G. G. (1979) Methods of anatomical and histochemical study of plant tissues M.: Nauka [in Russian]
5. Hrynchuk, K, Antipov, I. (2015) Molecular diagnostics and identification of the beet necrotic yellow vein virus: methodical recommendations. Metodical recommendations, 24 [in Ukrainian]
6. Hrynchuk, K.V., Antipov, I.O., Kyrychenko, A.M. Krayeva, H.V., Likhanov, A.F. (2018) Diagnosis of beet necrotic yellow vein virus circulating in Ukraine Mikrobiol. zhurn., 80 (1), 67-77 [in Ukrainian]
7. Koenig, R., Kastirr, U., Hotschulte, B., Deml, G., Varrelmann, M. (2008). Distribution of various types and P25 subtypes of Beet necrotic yellow vein virus in Germany and other European countries. Arch. Virol., 153, 2139–2144. doi: 10.1007/s00705-008-0234-3 [in English]
8. Kovalev, V. N., Popova N. V., Kislichenko, V. S. (2003) Pharmacognosy guide. Kh.: Izd-vo NFaU «Zolotyye stranitsy» [in Russian]
9. McGrann, G.R.D., Grimmer, M.K., Mutasa-Göttgens, E.S. , Stevens, M. (2009) Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. Mol. Plant Pathol., 10, 129–141 [in English]

10. Nurmuhammedov, A. K. (2006) Increasing of the stability of sugar beets to pathogens of rhizomania, rotten root crops and coronet stains. Doctor`s thesis. Kiev: National University of life and environmental sciences [in Ukrainian]
11. Pausheva, Z. P. (1988) Plant cytology guide. M.: Agropromizdat [in Russian]
12. Sibgatullina, G. V., Khayertdinova, L. R. and Gumerova, Ye. A. (2011) Methods for determining the redox status of cultivated plant cells. Kazan': Kazanskiy (Privolzhskiy) Federal'nyy universitet [in Russian]

K. Hrynchuk (2019). PATHOGENESIS OF SUGAR BEETS WITH MIXED INFECTIONS. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 10(3): 71–83.*
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/13082

Abstract. *Sugar beet plantations were monitored in agrocenoses of Cherkasy region with both symptoms and no symptoms of viral diseases. Plant diagnostics by polymerase chain reaction was performed. The presence of beet mosaic virus, beet yellows virus, beet necrotic yellow vein virus and the presence in the tissues of leaf hyphae of phytopathogenic fungi, in particular Alternaria tenuissima. The lesion of the fungal disease was accompanied by the characteristic proteolytic destruction of the cell walls, especially intensive destruction of the tissues was observed in the conductive bunches of leaf petioles. The hyphae were found in the xylem vessels and by the nature of their spatial orientation in a series of sections, it is evident that the fungi spread in the tissues of the leaf mainly by conducting bundles. It is also shown that when fungi lesions of the covering tissues of the petiole in cells intensively develops a hypersensitivity reaction of plants, which is accompanied by ligninification and probing of the cell walls of the main parenchyma. It has been shown that under conditions of infection of sugar beet virus with necrotic yellowing of beet veins, in the phloem cells of conductive leaf bundles, the content of peroxidases bound to cell walls decreases against the background of accumulation of free isoenzymes in protoplasts of sieve tubules and cell tubules. The redistribution of peroxidase molecules in cell compartments is accompanied by a significant increase in their activity. In the case of mixed infections in the parenchyma of the sugar beet root, specific middle polar terpenoid compounds have also been identified. It can be a potential biochemical markers of viral pathogenesis.*

Keywords: *beet necrotic yellow vein virus, beet mosaic virus, beet yellows virus, polymerase chain reaction, patogenes, peroxidase.*

Гринчук К.В. (2019). ПАТОГЕНЕЗ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В УСЛОВИЯХ СМЕШАННОЙ ИНФЕКЦИИ. *BIOLOGICAL SYSTEMS: THEORY AND INNOVATION, 10(3): 71–83.*
http://journals.nubip.edu.ua/index.php/Biologiya/editor/submission/13082

Аннотация. *Показано, что в условиях инфицирования сахарной свеклы вирусом некротического пожелтения жилок свеклы, в клетках флоэмы проводящих пучков листьев содержимое пероксидаз, связанное с клеточными стенками, уменьшается на фоне накопления свободных изоферментов в протопластах ситовидных трубок и клеток-спутниц. Перераспределение молекул пероксидазы в компартментах клеток сопровождается значительным повышением их активности. При смешанной инфекции в паренхиме корнеплодов сахарной свеклы также выявлены специфические среднеполярные терпеноидные соединения, которые являются потенциальными биохимическими маркерами вирусного патогенеза.*

Ключевые слова*: вирус некротического пожелтения жилок свеклы, вирус мозаики свеклы, вирус желтухи свеклы, полимеразная цепная реакция, патогенез, пероксидаза*