

Вплив вірусу смугастої мозаїки пшениці на параметри індукованої флюоресценції рослин *Triticum aestivum*

С. О. Чернюк, А. Л. Бойко, Д. Ю. Корнєєв, П. М. Маменко

Київський університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

За допомогою методу індукованої флюоресценції хлорофілу досліджено вплив вірусної інфекції на стан фотосинтетичного апарату рослин пшениці, зокрема на фотосистему 2. Описано зв'язок між параметрами індукованої флюоресценції хлорофілу та концентрації вірусу в клітині.

Вступ. Захворювання, яке викликається вірусом смугастої мозаїки пшениці, є найпоширенішим серед рослин роду *Triticum*. На нього припадає близько 60—70 % усіх вірусних хвороб пшениці [1].

Відомо, що вірус смугастої мозаїки пшениці має ниткувату форму, розміри його коливаються в межах 700—800 на 13—16 нм. Це РНК-вмісний вірус з групи *Potyvirus*. Локалізується він у цитоплазмі інфікованих клітин [2]. До цього часу в науковій літературі ми не зустрічали результатів досліджень впливу цього патогена на параметри індукованої флюоресценції хлорофілу.

Вивчення впливу вірусної репродукції на електронний транспорт у фотосистемі 2 фотосинтетичного апарату (ФСА) рослини має принципово нове та, безперечно, важливе значення для розуміння патологічної дії вірусного агента. Останнє може бути корисним у практичному плані для знаходження та підбору надійних засобів боротьби зі згаданим патогеном.

Одним з ефективних методів вивчення стану ФСА є метод індукції флюоресценції хлорофілу (ІФХ), який базується на наявності змін інтенсивності флюоресценції хлорофілу після початку освітлення адаптованого до темряви листка [3]. Згідно з гіпотезою Дюйзенса та Свірса, інтен-

сивність флюоресценції залежить від окислювально-відновлювального стану Q_a , первинного акцептора електронів ФС2 [4]. Перевагами цього методу є експресність, статистична надійність та можливість проведення досліджень без руйнування нативної структури об'єкта. Залежність інтенсивності флюоресценції хлорофілу від часу, який минув від початку освітлення, називається індукційною кривою. У формі останньої міститься інформація про перебіг процесів як світлової, так і темної фази фотосинтезу в нормі та інфекційному процесі.

Враховуючи вищевикладене, було вирішено використати метод ІФХ для вивчення впливу вірусної репродукції на стан ФСА уражених рослин пшениці. Основною метою досліджень було прослідкувати залежність параметрів кривих ІФХ від концентрації вірусу в листках рослин пшениці.

Матеріали та методи. Для проведення експерименту використовували рослини пшениці *T. aestivum* сорту Альбатрос Одеський як здорові, так і заражені вірусом смугастої мозаїки пшениці. Всі рослини вирощували в однакових ґрунтово-кліматичних умовах. Для проведення досіду відбирали рослини на стадії виходу в трубку. Інфіковані рослини відбирали візуально по симптомах та за допомогою непрямого імуно-ферментного аналізу (ІФА) (сендвіч-метод) з антисироватками до вірусу смугастої мозаїки пшениці та до інших вірусів за відомою методикою [5, 6]. Для тестування стану ФСА застосовували метод ІФХ. Перед вимірю-

ванням листки зрізували, ставили у воду і адаптували до темряви протягом 30 хв. В експерименті використовували висічки з середньої частини листової пластини. При дослідженні параметрів ІФХ використовували рослини на стадії виходу в трубку, з яких брали висічки верхнього, середнього та нижнього листків для простеження циркуляції збудника в рослині.

Для запису кривих ІФХ застосовували однопроменеву установку, зібрану у відділі біохімії фотосинтезу Інституту фізіології рослин та генетики НАН України. Флюоресценцію збуджували випромінюванням ртутної дугової лампи ДРШ-250-2, яке пропускали крізь фотозатвор (час відкриття 3 мс), синьо-зелений фільтр СЗС-3 та кювету з 2 %-м розчином CuSO_4 . Флюоресценцію фіксували за допомогою монохроматора МДР-2 на довжині хвилі 685 нм. Сигнал від фотопомножувача ФЕП-79 подавали на запам'ятовуючий осцилограф С8-13 або через аналого-цифровий перетворювач на ПЕОМ. Максимальна частота запису даних дорівнювала 9,09 кГц. На графіках зображали середні з трьох біологічних повторностей та середньоквадратичні відхилення.

Після того як рослини було використано для реєстрації параметрів індукованої флюоресценції, аналізували сік на наявність ВСМП, записували криві титрування та визначали титр вірусу.

Результати і обговорення На рис. 1 показано типові криві ІФХ листків пшениці. Основними параметрами цих кривих є F_0 — рівень флюоресценції на момент повного відкриття фотозатвору; F_{pl} — рівень флюоресценції на момент досягнення

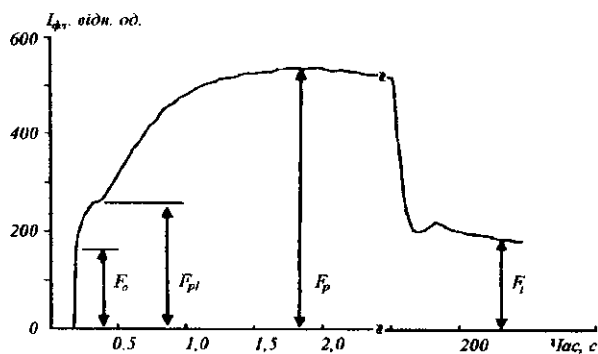


Рис. 1. Типова крива індукції флюоресценції листків пшениці

Зміна параметрів індукованої флюоресценції при ураженні рослин пшениці ВСМП на стадії виходу в трубку

Листок рослини	Параметри ІФХ		
	F_p/F_0	F_p/F_t	$(F_{pl} - F_0)/F_v$
Верхній			
здоровий	3,3±0,09	2,14±0,03	0,40±0,03
заражений	2,27±0,31	1,90±0,21	0,44±0,04
Середній			
здоровий	2,42±0,25	1,81±0,13	0,39±0,04
заражений	1,66±0,15	1,79±0,16	0,44±0,04
Нижній			
здоровий	1,38±0,14	1,71±0,14	0,57±0,02
заражений	0,61±0,07	1,26±0,13	0,72±0,05

тимчасового сповільнення зростання сигналу флюоресценції, так званого «плато»; F_p — рівень флюоресценції на момент досягнення піка P ; F_t — рівень флюоресценції через 5 хв після початку освітлення.

Співвідношення F_v/F_0 , де $F_v = F_p - F_0$ (варіабельна флюоресценція) часто використовується як показник фотохімічної активності ФС2 [4]. Оскільки у більшості випадків експоненційна фаза зростання змінної флюоресценції (від F_0 до F_{pl}) пов'язана з відновленням Q_a в тих комплексах ФС2, які не здатні транспортувати електрони від Q_a до Q_b (Q_b -невідновлюючих), а сигмоїдальна (від F_{pl} до F_p) — з відновленням Q_a в Q_b -відновлюючих комплексах ФС2 [8], то співвідношення $(F_{pl} - F_0)/F_v$ може бути використане для оцінки вмісту Q_b -невідновлюючих комплексів ФС2 [7]. На зменшення інтенсивності сигналу після піка P , окрім нефотохімічних процесів дисипації енергії збудження молекул хлорофілу, істотно впливають процеси темної фази фотосинтезу, тому співвідношення F_p/F_t певною мірою залежить від ефективності реакцій поглинання вуглекислого газу [4].

У нашому випадку спостерігалася зміна параметрів F_v/F_0 , F_p/F_t , $(F_{pl} - F_0)/F_v$ при зараженні рослин пшениці вірусом смугастої мозаїки (таблиця), що вказує на наявність певної концентрації патогена. При цьому реєструвалося зменшення величини параметра F_v/F_0 . Це свідчить про зниження фотохімічної активності фотосистеми 2, що підтверджує патологічний вплив вірусу на ФСА

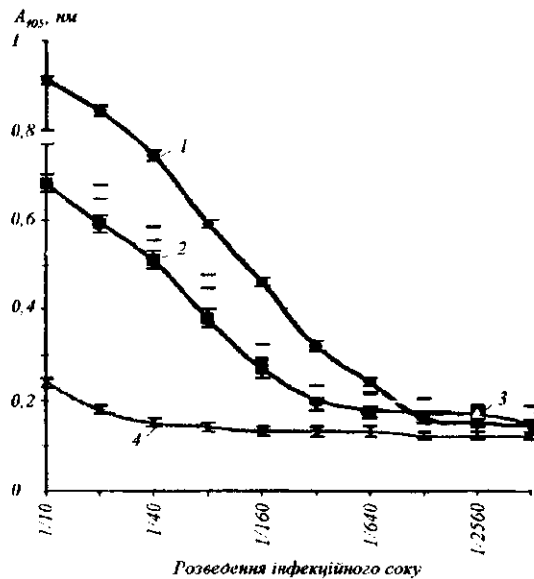


Рис. 2. Криві титрування інфекційного соку рослин *Triticum aestivum* на стадії виходу в трубку

клітин пшениці. Крім того, спостерігалось зниження величини параметра F_p/F_0 , яке може викликатися зменшенням ефективності темної фази фотосинтезу.

Якщо при вірусному ураженні параметри F_p/F_0 та F_p/F_t зменшувалися, то параметр $(F_{pl} - F_0)/F_v$, навпаки, збільшувався. Величина параметра $(F_{pl} - F_0)/F_v$ зростає у випадку збільшення відносної кількості Q_2 -невідновлюючих комплексів фотосистеми 2, які не беруть участі у лінійному транспорті електронів, що в свою чергу призводить до зменшення накопичення первинних продуктів фотосинтезу. Це звичайно спостерігається при патології.

Отже, аналізуючи дані нашого експерименту, можна зробити висновок, що вірус смугастої мозаїки пшениці негативно впливає на стан ФСА, зокрема фотосистеми 2. У цей період наступає повільне знебарвлення листя, що на сьогоднішній день використовується для дистанційної діагностики хвороб рослин.

Після проведення ІФА було встановлено титр вірусу у верхніх, середніх та нижніх листках дослідних рослин. Слід відмітити, що концентрація збудника у верхніх та середніх листках була однаковою, а концентрація його в нижніх листках —

більшою (рис. 2). Максимальне розведення інфекційного соку нижніх листків, яке давало позитивний сигнал на наявність вірусу смугастої мозаїки пшениці, становило 1/320. Для середніх та верхніх листків це розведення складало 1/160.

Порівняння результатів імуноферментного аналізу з даними індукції флюоресценції хлорофілу свідчить, що в листках з більшою концентрацією вірусу смугастої мозаїки пшениці варіювання величин параметрів ІФХ було більшим, ніж в листках з меншою його концентрацією. Наприклад, співвідношення дослід / контроль для параметра $(F_{pl} - F_0)/F_v$ у нижніх листках становило 1,26. Для варіантів з меншим вмістом вірусу (верхні та середні листки) це співвідношення дорівнювало 1,10 та 1,12 відповідно. Для параметра F_p/F_t значення дослід/контроль становило 0,89; 0,98; 0,73 у випадку верхніх, середніх та нижніх листків відповідно. Співвідношення дослід/контроль для параметра F_p/F_0 становило відповідно 0,69, 0,68 та 0,44 при аналізі верхніх, середніх та нижніх листків.

Таким чином, існує зв'язок між концентрацією вірусу смугастої мозаїки пшениці в клітинах рослин *T. aestivum* та величиною зміни показників параметрів індукованої флюоресценції. Наявність такого зв'язку можна використати при розробці нових методів діагностики фітовірусів та для вивчення їхніх біологічних особливостей, виходячи з впливу на фотосинтетичний апарат клітини.

С. О. Чернюк, А. Л. Бойко, Д. Ю. Корнеев, П. М. Маменко

Влияние вируса полосатой мозаики пшеницы на параметры индуцированной флюоресценции растений *Triticum aestivum*

Резюме

С помощью метода индуцированной флюоресценции хлорофилла исследовано влияние вирусной инфекции на состояние фотосинтетического аппарата растений пшеницы, в частности на фотосистему 2. Описано связь между параметрами индуцированной флюоресценции хлорофилла и концентрацией вируса в клетке.

S. O. Chernyuk, A. L. Boyko, D. Yu. Korneyev, P. M. Mamenko

The influence of wheat virus infection on the induction parameters of *Triticum aestivum* plants fluorescence

Summary

Using a method of induced fluorescence of chlorophyll the influence of virus infection on the state of wheat photosynthetic apparatus has been researched, in particular, on the photosystem 2. The connection between induced chlorophyll fluorescence parameters and the concentration of virus in the cell is described.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко А. Л., Силасва А. М., Міценко Л. Т., Решетник Г. В. Особливості ультраструктурної організації клітин ме-

- зофілу озимої пшениці за умов вірусної інфекції // Цитологія і генетика.—1997.—31, № 5.—С. 71—79.
2. *Бойко А. Л., Мищенко Л. Т., Барышевский А. Н., Глуздяев В. Г., Гейко Н. И., Краснокузов А. Т., Бублик П. И.*, Рекомендации по диагностике вирусных болезней озимой пшеницы и мерам борьбы с ними в условиях УССР.—Киев.: Урожай, 1990.—24 с.
 3. *Карпетян Н. В., Бухов Н. Г.* Переменная флуоресценция хлорофилла как показатель физиологического состояния растений // Физиология растений.—1986.—33, № 5.—С. 1013—1026.
 4. *Корнеев Д. Ю.* Использование производных для анализа индукционных кривых флуоресценции хлорофилла // Физиология и биохимия культ. растений.—1997.—29, № 2.—С. 146—151.
 5. *Гнутова Р. В.* Серология и иммунохимия вирусов растений.—М.: Наука, 1993.—300 с.
 6. *Егоров А. М., Осипов А. П., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М.* Теория и практика иммуноферментного анализа.—М.: Высш. шк., 1991.—288 с.
 7. *Кочубей С. М., Корнеев Д. Ю.* Обнаружение Q_b -восстанавливающих комплексов фотосистемы II на экспонированных в строму участках тилакоидов после фосфорилирования мембранных белков // Физиология растений.—1997.—44, № 6.—С. 933—938.
 8. *Melis A.* Dynamics of photosynthetic membrane composition and function // Biochim. et biophys. acta.—1991.—1058, N 1.—P. 87—106.

УДК 578.24.242.2:58.071:58.083#57.083
Надійшла до редакції 30.04.98