

В процессе вегетации проводился учёт густоты стояния в фазу цветения, отбор образцов зелёной массы (2 срока) и корней. Определялись масса и количество клубеньков на корнях. Фасоль созрела в конце сентября. Урожай убирался вручную, поделаячно. Некоторые результаты опыта приведены в таблице.

Из таблицы видно, что инокуляция семян фасоли перед посевом позволила увеличить урожайность фасоли. Положительное действие оказали все изученные штаммы. Наиболее существенное повышение урожайности наблюдается при применении IV штамма. Таким образом, опыты показывают эффективность инокуляции семян фасоли перспективными штаммами клубеньковых бактерий для увеличения урожайности этой бобовой культуры.

Литература

1. Боднар Г.В., Лавриненко Г.Т. Зернобобовые культуры. - М., 1977. - 439 с.
2. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. - М., 1973. - 365 с.
3. Растениеводство / Под ред. П.П. Вавилова. 4-е изд., доп. и перераб. - М.: Колос, 1979. - 519 с.

УДК 576.858.8

НАКОПЛЕНИЕ АНТИГЕНА ВИРУСА МОЗАИКИ И КИСЛЫХ РР-БЕЛКОВ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ СОИ С РАЗНОЙ УСТОЧИВОСТЬЮ К ВИРУСУ

**М. В. Сапоцкий, А. М. Полякова, Н. Н. Какарека,
В. И. Малиновский (БПИ ДВО РАН)**

Содержание антигена вируса мозаики сои в листьях чувствительных (сорт Приморская 529) растений сои *Glycine max* (L.)

Мегг. с хорошо выраженными симптомами заболевания было достоверно выше, чем у толерантных (сорта Ходсон, Peking) бессимптомных растений. В листьях крайне устойчивых растений сои (сорт Dewatusume) вирусный антиген в очень низкой концентрации был обнаружен только через 2 недели после заражения. Через 2 недели после инокуляции в экстрактах из листьев больных чувствительных растений содержание ряда кислых PR-белков значительно увеличивалось по сравнению со здоровым контролем, тогда как у толерантных и крайне устойчивых растений содержание и состав PR-белков существенно не менялись.

Об устойчивости растений к вирусам можно судить по накоплению и транспорту вирусного материала. У чувствительных растений вирус транспортируется из первично зараженных клеток по всему растению, хорошо размножается и вызывает симптомы заболевания. Толерантные растения заражаются и накапливают вирус, который распространяется по растению. Различают толерантность к вирусу: формируются симптомы заболевания, но ингибируется размножение вируса, и толерантность к болезни, которая проявляется только в ослаблении симптомов. Возможно отсутствие симптомов заболевания и слабое накопление вируса. В крайне устойчивых растениях вирус репродуцируется в первично зараженных клетках.

Предполагается [15], что одним из механизмов устойчивости растений к патогенам, в том числе и к вирусам, является накопление PR (pathogenesis-related)-белков. В 1999 году на основе аминокислотной последовательности, серологических свойств, энзимной и биологической активности была создана унифицированная для всех растений номенклатура PR-белков, состоящая из 14 семейств (PR-1 – PR-14) [17]. Некоторые PR-белки имеют протеазную, РНК-азную, 1,3-β-глюканазную, хитиназную активности или являются ингибиторами протеаз [16]. Судя по их свойствам, PR-белки могут защищать растения от насекомых-

вредителей, грибов и бактерий. Роль PR-белков в вирусоустойчивости растений до сих пор не ясна.

При изучении защитных механизмов растений может быть полезным использование близкородственных растений, по-разному реагирующих на заражение одним и тем же вирусом. Целью настоящей работы являлось изучение накопления антигена вируса мозаики сои (ВМС) и кислых PR-белков в листьях чувствительных, толерантных и крайне устойчивых к этому вирусу растений сои.

Материал и методика

В опытах использовали чувствительные (сорта Приморская 529, Венера) [2], толерантные (сорта Ходсон, Peking) и крайне устойчивые (сорт Dewamusume) [11] к ВМС растения сои *Glycine max* (L.) Merr. Растения выращивали в теплице в нерегулируемых условиях. У 14-дневных растений, в фазе раскрытия первого тройчатого листа, механически заражали оба первичных простых листа разбавленным соком из листьев растений сои сорта Приморская 529, зараженных среднепатогенным штаммом ВМС [3]. Сок разводили 50 мМ фосфатным буфером pH 7,0 в соотношении 1:2. Контрольные растения инокулировали соком здоровых растений в том же разведении.

Содержание вирусного антигена в экстрактах из листьев определяли, как описано ранее [4]. Экстракцию кислых PR-белков проводили путем гомогенизации растительной ткани в фосфатцитратном буфере pH 2,8 [9]. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин. при 8000 g. Осадок отбрасывали, а надосадочную жидкость концентрировали, используя Sephadex G-25. Разделение PR-белков по классам осуществляли минигель-электрофорезом в 15% полиакриламидном геле по методике Doucet et al. [7], применяя ту же буферную систему, но без додецилсульфата натрия. К пробам добавляли буферный раствор со смесью красителей бромфенолового синего и ксиленцианола в

5% фиколле (в конечном разведении). Электрофорез вели до достижения зоной ксиленцианола нижнего края блока. После окончания электрофореза гели фиксировали и окрашивали раствором кумасси R 250 в смеси этиловый спирт - уксусная кислота - вода (4,5: 1: 4,5). Гели хранили в 10% уксусной кислоте. Определение количества белка в окрашенных зонах проводили путем сканирования гелей с разрешением 2400 пикселей/дюйм сканером ScanPrisa 640S (Acer) и сравнения условной оптической плотности изображений полученных зон с калибровочной кривой зависимости оптической плотности зон от количества белка в них, используя компьютерные программы Adobe Photoshop 6 и Sigma Plot 4.

Во всех вариантах каждого опыта было по 5 биологических повторностей. Одно растение представляло собой одну биологическую повторность. В таблицах представлены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты

При заражении простых первичных листьев чувствительных растений сои мозаичные симптомы проявлялись уже через одну неделю только на листьях 2-го яруса. Такие симптомы, как морщинистость и деформация листовой пластинки, были выражены у самых молодых листьев. В течение всего времени опыта (3 недели после заражения) мы не обнаружили видимых симптомов заболевания у толерантных растений. На 4-5 неделе после инокуляции слабые симптомы появлялись и на толерантных растениях. В отдельных опытах на инокулированных листьях растений сорта Dewatusime формировались красновато-коричневые местные поражения. В других частях этих растений видимых симптомов не отмечено.

Через одну неделю после заражения у чувствительных растений вирусный антиген обнаруживали в инокулированных листьях нулевого яруса и тройчатых листьях 2-го яруса. В процес-

201101

се роста растений он выявлялся в прирастающих листьях. Распределение вирусного антигена в листьях разных ярусов толерантных растений было похоже на распространение вируса в чувствительных растениях. Однако содержание вирусного антигена в листьях толерантных растений было значительно ниже, чем в листьях чувствительных растений. В растениях сорта Peking он накапливался медленнее, чем в растениях сорта Ходсон (табл. 1). Мы обнаружили очень низкое содержание антигена ВМС через две недели после заражения в листьях нулевого и 2-го ярусов растений сорта Dewatusume, а через три недели он обнаруживался в следовых количествах и в листьях 3-го и 4-го ярусов.

Таблица 1

Содержание антигена ВМС в листьях растений сои с разной устойчивостью к вирусу
(мкг антигена на 1 см² листовой поверхности)

Сорт растения	Время после инокуляции, недель		
	1	2	3
Приморская 529	0,48 ± 0,01	2,20 ± 0,02	1,93 ± 0,02
Ходсон	0,03 ± 0,01	1.60 ± 0,01	1.16 ± 0,02
Peking	0	0,03 ± 0,01	0,64 ± 0,05
Dewatusume	0	+	+

Примечание. «+» – вирусный антиген присутствует в следовых количествах (менее 0,02 мкг/см²).

Было установлено, что через 1 неделю после инокуляции содержание и состав PR-белков в экстрактах листьев инфицированных растений всех использованных сортов не отличались от контроля (рис. 1 и 3, табл. 2). Через 2 недели после заражения содержание всех PR-белков и особенно белков групп, которые мы условно, в соответствии с уменьшением их подвижности в геле, обозначили как р1-р5, в листьях больных чувствительных

растений существенно увеличивалось (рис. 2 и 3, табл. 2). Через 3 недели содержание PR-белков, в том числе белков групп p1 – p5, в листьях этих растений оставалось высоким, однако их количественное соотношение менялось. У толерантных и крайне устойчивых растений содержание и состав PR-белков не менялись по сравнению со здоровым контролем в течение всего времени опыта (3 недели после инфицирования).

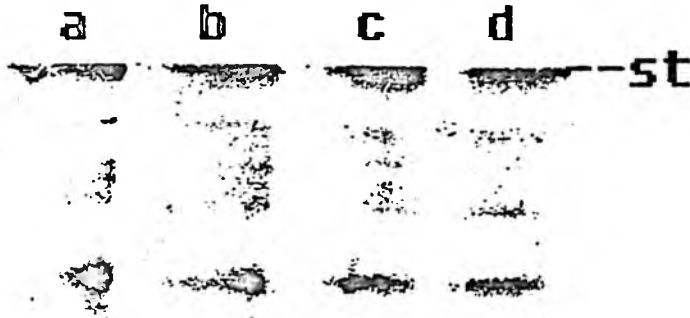


Рис. 1. Кислые PR-белки в экстрактах из листьев растений сои сортов Приморская 529 и Peking, 1 неделя после инокуляции вирусом мозаики сои:

а – экстракт из здоровых растений сорта Приморская 529; б – экстракт из здоровых растений сорта Peking; с – экстракт из инфицированных растений сорта Приморская 529; д – экстракт из инфицированных растений сорта Peking; st – линия старта

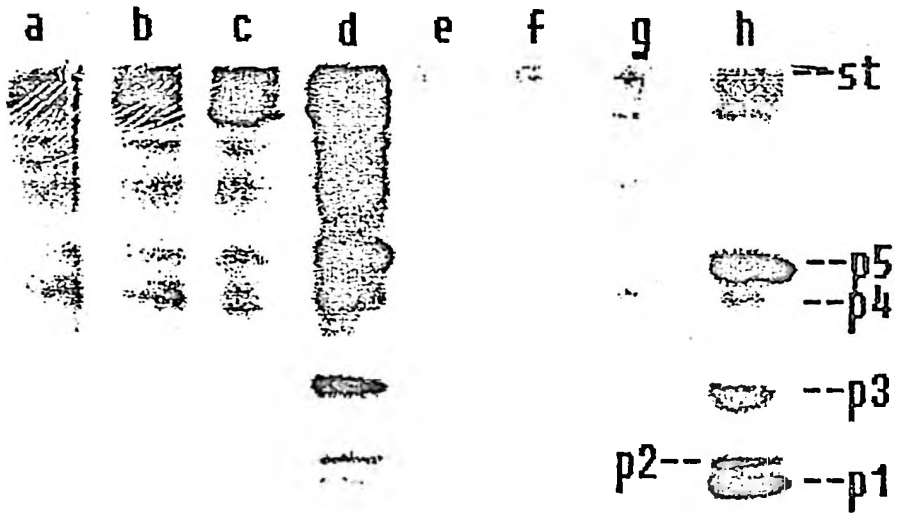


Рис 2. Кислые PR-белки в экстрактах из листьев растений сои сортов Приморская 529 и Peking, 2 и 3 недели инокуляции вирусом мозаики сои:

вторая неделя после инокуляции: а – здоровые растения сорта Peking; б – здоровые растения сорта Приморская 529; в – инфицированные растения сорта Peking; д – инфицированные растения сорта Приморская 529; третья неделя после инокуляции: е – здоровые растения сорта Peking; ф – здоровые растения сорта Приморская 529; г – инфицированные растения сорта Peking; h – инфицированные растения сорта Приморская 529; --p1 --p5 – зоны PR-белков; st – линия старта

Кислые PR-белки у инфицированных ВМС
чувствительных растений сои

Сорт растения	Количество белка в зоне (мкг)			
	зона	недели после инокуляции		
		1	2	3
Приморская 529	p1	+	2,0 ± 0,1	4,5 ± 0,2
	p2	+	3,0 ± 0,2	1,3 ± 0,3
	p3	+	4,7 ± 0,1	4,5 ± 0,2
	p4	+	10,2 ± 0,4	7,0 ± 0,1
	p5	+	8,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1
Венера	p1	+	6,2 ± 0,3	-
	p2	+	2,5 ± 0,2	-
	p3	+	11,6 ± 0,3	-
	p4	+	9,8 ± 0,3	-
	p5	+	12,3 ± 0,2	-

Примечание. «+» - следовые количества белка в зонах;
"- " - не определяли.

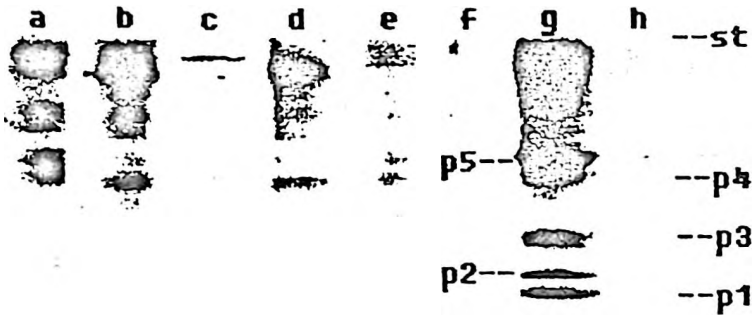


Рис 3. Кислые PR-белки в экстрактах из листьев растений сои сортов Венера и Ходсон, 1 и 2 недели после инокуляции вирусом мозаики сои:

первая неделя после инокуляции: а – здоровые растения сорта Венера; б – здоровые растения сорта Ходсон; с – инфицированные растения сорта Венера; д – инфицированные растения сорта Ходсон; вторая неделя после инокуляции: е – здоровые растения сорта Венера; ф – здоровые растения сорта Ходсон; г – инфицированные растения сорта Венера; h – инфицированные растения сорта Ходсон; -- p1- --p5 – зоны PR-белков; st – линия старта

Обсуждение результатов

В наших опытах распределение антигена ВМС в листьях разных ярусов чувствительных и толерантных к этому вирусу растений сои было одинаковым. Однако накапливался вирусный антиген в больных бессимптомных толерантных растениях сортов Ходсон и Peking значительно слабее, чем в листьях чувствительных растений сорта Приморская 529.

Считается [13], что в крайне устойчивых растениях вирусы размножаются только в первично зараженных клетках, но не транспортируются по растению. Наши данные свидетельствуют о том, что антиген ВМС может транспортироваться в крайне ус-

тойчивых к этому вирусу растениях сои, но уровень накопления его в листьях этих растений очень низок.

Нам не удалось передать инфекцию с растений сорта Dewamusume путем реинокуляции на чувствительные растения. Это может быть связано с высокой ингибирующей активностью сока листьев крайне устойчивых растений. Так, сок листьев чувствительных и крайне устойчивых растений сои (в разведении 1:1) ингибировал инфекционность вируса табачной мозаики на 78 ± 4 и 92 ± 1 %, соответственно. Кроме того, неудача реинокуляции может быть обусловлена очень низким содержанием ВМС в листьях растений сорта Dewamusume. И, наконец, не ясно, принадлежит ли выявленный в неинокулированных листьях антиген вирусным частицам или это отдельный структурный белок, попавший в эти листья вместе с током ассимилятов.

В наших опытах мы обнаружили, что с развитием заболевания у чувствительных растений, наряду с формированием мозаичных симптомов, накоплением и транспортом по растению антигена ВМС, увеличивалось общее содержание кислых PR-белков, и выявлялись белки (p1-p5), отсутствующие в заметных количествах в экстрактах из листьев здоровых растений. Накопление PR-белков в чувствительных растениях, пораженных вирусами, было показано ранее и другими авторами [14, 8, 1].

У толерантных и крайне устойчивых растений содержание и состав кислых PR-белков не менялись в ходе заболевания. Следовательно, была выявлена обратная корреляция между вирусостойчивостью растения и накоплением кислых PR-белков. Эти результаты свидетельствуют о том, что при системном вирусном поражении PR-белки, видимо, не способны играть существенной защитной роли. Имеются данные [10] о том, что активация в больных растениях табака 1,3- β -D-глюканаз (белков группы PR-2 [12]), может способствовать транспорту по растению вируса табачной мозаики. Ранее нами [6] было показано, что ВМС не влиял на активность этого фермента у растений сорта Dewa-

musume, но вызывал его активацию в растениях сои сорта Приморская 529. Видимо, чем больше повреждается растение в ходе поражения вирусами, тем больше накапливаются PR-белки.

Таким образом, различный характер изменений в содержании кислых PR-белков, распределении и накоплении вирусного антигена в растениях разных сортов сои в течение первых двух - трех недель после заражения может служить критерием вирусостойчивости этих сортов к ВМС.

Литература

1. Коваленко А. Г., Грабина Т. Д., Олевинская З. М. Выявление индуцированной устойчивости, антивирусных факторов и PR-белков у табака при системной вирусной инфекции // Тез. докл. VII съезда Укр. микробиол. о-ва. - Киев, 1989. Ч. 2. - С. 174-175.
2. Крылов А. В. Вирусы растений Дальнего Востока. - М.: Наука, 1992. - 112 с.
3. Поливанова Т. А., Зайцева Н. М., Слепухина Л. П., Степаненко В. И. Вирус мозаики сои и его штаммы // Штаммы вирусов растений. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1977. - С. 204-211.
4. Сапоцкий М. В., Какарека Н. Н., Полякова А. М. Диагностика фитопатогенных вирусов иммунопреципитацией с последующим гель-электрофорезом // Сельскохозяйственная биология. - 2001. - № 5. - С. 113-116.
5. Сапоцкий М. В., Андреева И. В., Какарека Н. Н., Полякова А. М., Малиновский В. И. Распределение антигена вируса мозаики сои в листьях растений сои с разной реакцией на вирусное поражение // Микробиол. журн. - 2002. - Т. 64. - №3. - С. 32-38.
6. Andreeva I. V., Burtseva Yu. V., Malinovskiy V. I., Zvyagintseva T. N. The effect of soybean mosaic virus on the activity of carbohydrases in leaves of sensitive and resistant soybean plants // Acta Phytopathol. Entomol. Hung. 2002. Vol. 37, № 4. P. 335-345.

7. Doucet J. P., Murphy B. J., Tuana D. S. Modification of discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel system for minigel electrophoresis // *Anal. Biochem.* 1990. Vol. 190, № 1. P. 209-214.

8. Fraser R. S. S. Are 'pathogenesis-related' proteins involved in acquired systemic resistance of tobacco plants to tobacco mosaic virus? // *J. Gen. Virol.* 1982. Vol. 58, № 2. P. 305-313.

9. Gianinazzi S., Pratt H. M., Shewry P. R., Mifflin B. J. Partial purification and preliminary characterization of soluble leaf proteins specific to virus infected tobacco plants // *J. Gen. Virol.* 1977. Vol. 34, P. 345-351.

10. Iglesias V. A., Meins F. Jr. Movement of plant viruses is delayed in a beta-1,3-glucanase – deficient mutant showing a reduced plasmadesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition // *Plant J.* 2000. Vol. 21. P. 157-166.

11. Ishikawa M., Matsumoto S., Nagasawa T., Hashimoto K., Koyama T., Kokubun K., Murakami S., Nakamura S., Miyahara T., Matsumoto S., Konno Z., Iizuka N., Takahashi K., Yunoki T. A new soybean variety "Dewamusume" // *Bull. Tohoku Stl. Agric. Exp. Sth.* 1979. Vol. 59. P. 71-86.

12. Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens // *Biochimie.* 1993. Vol. 75, № 8. P. 687-706.

13. Valkonen J. P. Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* spp.) // *Plant Breeding.* 1994. Vol. 112, № 1. P. 1-16.

14. Van Loon L. C., van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus // *Virology.* 1970. Vol. 40, № 2. P. 199-211.

15. Van Loon L. C. Pathogenesis-related proteins // *Plant Mol. Biol.* 1985. Vol. 4, № 1. P. 111-116.

16. Van Loon L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins // Pathogenesis-related proteins in plants. 1999. Boca Raton, London, New York, Washington: CRC Press. Edited Datta S. K., Muthukrishnan S. P. 1-19.

17. Van Loon L. C., van Strien E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1999. Vol. 55, № 1. P. 85-97.

УДК 631.8.001.4:631.524.84:633.853.52

**ПРОДУКЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПОСЕВОВ СОИ
В ДЛИТЕЛЬНЫХ ОПЫТАХ С УДОБРЕНИЯМИ
Е. Т. Наумченко, И. Г. Ковшик, А. В. Кондратова
(ВНИИ сои)**

Изучение влияния системы удобрений на продукционные процессы проводится в длительных стационарных опытах, заложенных в 1962-1964 гг. в пятипольном соево-зерновом севообороте на луговой черноземовидной почве опытного поля ВНИИ сои.

В статье обсуждаются результаты исследований, проведенные с соей, высеваемой четвертой культурой севооборота по предшественнику пшенице (табл. 1). Приведенные данные – средние за 4 года исследований (VII ротация – 1995-1997 гг. и 2000 год VIII ротация севооборота). Сорт сои – Октябрь 70. Площадь делянки в опытах 180 м², повторность 3-кратная во времени и пространстве. Удобрения: аммиачная селитра, двойной гранулированный суперфосфат и хлористый калий вносились весной под культивацию, полуперепревший навоз – осенью под основную обработку почвы. Почвенные и растительные образцы отбирались по основным фазам роста и развития сои; хи-