

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД  
ОТДЕЛ БИОХИМИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

**КЛЕТОЧНЫЕ ЯДРА И ПЛАСТИДЫ  
РАСТЕНИЙ:  
БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

Сборник материалов Международной конференции,  
г. Минск,  
26-28 мая 2004 г.

Минск  
УП «ТЕХНОПРИНТ»  
2004

**Клеточные  
ядра  
и пластиды  
растений:**

*биохимия и биотехнология*

26-28  
Май 2004 МИНСК



## ВЗАИМОВЛИЯНИЕ X-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ И ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ ПРИ СМЕШАННОЙ ИНФЕКЦИИ

Власова А.Б.<sup>1</sup>, Палилова А.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Центральный ботанический сад НАН Беларуси,  
220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В,  
e-mail: biolog@it.org.by

<sup>2</sup>Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,  
220072, г. Минск, ул. Академическая, 27.

**Введение.** Изучение биохимической природы взаимоотношений «растение – его патоген» является одной из наиболее актуальных задач современной селекции. Культура картофеля в сильной степени подвержена вредоносному влиянию вирусных патогенов, из которых X-вирус картофеля (ХВК) является наиболее распространенным на посевах картофеля в Республики Беларусь, а вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК, LBK) расценивается наиболее вредоносным [1]. Трудностью в борьбе с вирусными инфекциями растений является то, что у растений не наблюдается классического явления интерференции, и они могут быть инфицированы двумя и более вирусами одновременно. Смешанная инфекция ХВК и ВСЛК приводит к более существенным потерям урожая картофеля. Поскольку картофель является вегетативно размножаемой культурой, то существует постоянная опасность накопления вирусной инфекции в последующих поколениях.

Являясь представителями различных групп, ХВК и ВСЛК обладают РНК-овым геномом и содержат в своем геноме участки, кодирующие транспортные белки. Однако ВСЛК распространяется по растению «пассивно» по сосудистой системе растения (флоэме), тогда как ХВК активно способен проникать в клетки растений [2-4]. Исходя из вышесказанного, больше значение для селекции перспективных вирусостойчивых сортов картофеля является изучение совместного влияния вирусных патогенов на организм растения, а также изучение их взаимовлияния при комплексной инфекции. Вместе с тем, в

настоящее время все больше данных появляется по исследованиям белковых модификаций у растений в связи с вирусной инфекцией и процессами устойчивости. По последним данным посттрансляционные модификации белков (фосфорилирование, гликозилирование и др.) могут участвовать в регуляции различных процессов, связанных с устойчивостью растений к патогенам [5-7].

Объектом данного исследования являлись родственные клоны *Solanum tuberosum* контрастные по устойчивости к X- и L-вирусам картофеля (ХВК, ВСЛК), предметом – особенности компонентного состава спектров белковых фракций в зависимости от устойчивости клонов к данным вирусам, а также степень проявления в восприимчивых растениях вирусной активности (на уровне экспрессии вирусных белков).

**Материалы и методы.** При выполнении работы использовали методы фракционирования различных белков, электрофоретическое разделение полипептидов в ПААГ в денатурирующих условиях, иммуноидентификацию белков с помощью Вестерн-блоттинга, иммуноферментный анализ, вирусологические методы.

Для исследований были использованы клоны картофеля из оригинальной коллекции, созданной в лаборатории фитоиммунитета ИГиЦ НАНБ в процессе исследований развития вирусной инфекции в растениях картофеля, различающиеся по устойчивости к X- и L-вирусам: обладающие длительной устойчивостью к X- (ХВК) и L- (ВСЛК) вирусам; устойчивые к одному из вирусов и восприимчивые ко второму; нестабильные по устойчивости, или восприимчивые к обоим вирусам. Коллекция создана методом многоступенчатого отбора на основе данных иммуноферментного анализа содержания X- и L-вирусов в соке растений картофеля [8,9]. Растения клонов сохраняют жизнеспособность и проявляют стабильные показатели.

Иммуноферментный анализ на содержание ХВК и ВСЛК в листьях растений картофеля проводили с использованием стандартных диагностических наборов (НПО по картофелеводству РСА, Коренево, Россия) по стандартной методике с модификациями, предлагаемыми производителем [10].

Выделение щелочерастворимой и кислоторастворимой фракций белков из зеленого листового материала картофеля осуществляли методом Сафоновых средами, содержащими 0,001 М аскорбиновой кислоты, 0,0375 М трис-НСl, рН 8,8, и 0,2 М ацетатным буфером (рН 4,7), содержащим 0,2 М ацетата и 0,2 М ацетата натрия, соответственно [11]. В среду для экстракции для подавления активности эндогенных протеиназ добавляли 10 мкг/мл PMSF, 5 mM ЭДТА и 0,1 mM N-этиленмалеимид. Выделение хлоропластов и белков цитозоля из листьев 14-суточных растений картофеля осуществляли по Гавриленко и соавт. методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы [12] с использованием буфера для экстракции, содержащего 0,225 М сахарозы, 0,01 М MgCl<sub>2</sub>, 0,004 М цистеина, 0,05 М трис-НСl, рН 7,5. Все операции проводили на льду. Белки хлоропластов разделяли на мембраносвязанную и стромальную фракции центрифугированием в течение 5-7 минут при 2000 g.

Электрофоретическое разделение белковых компонентов осуществляли в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной системе с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Laemmli [13]. Определение молекулярных масс исследуемых пептидов производили с использованием специализированного программного обеспечения для ПЭВМ («SigmaGel», Германия) на основе известных молекулярных масс белков-маркеров.

Идентификацию вирусных белков проводили методом иммуноблоттинга (Western blotтинг) с помощью специфических поликлональных антител к ХВК и ВСЛК, любезно предоставленных профессором Z. Mierzwa (Институт акклиматизации растений, Польша). В качестве положительного контроля были использованы очищенные вирусные препараты (ХВК, ВСЛК), также полученные от профессора Z. Mierzwa. Отрицательным контролем служили образцы растений картофеля, которые не содержали вирусов, как было определено с помощью специфического ИФА.

**Результаты и их обсуждение.** Ранее на имеющейся экспериментальной модели родственных клонов *S.tuberosum* нами были определены белковые фракции, наиболее активно отвечающие на атаку патогена. Среди них резкие отличия между ус-

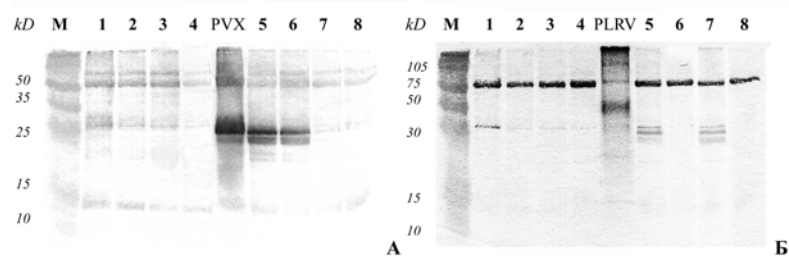
тойчивыми и восприимчивыми клонами были продемонстрированы для кислоторастворимой, цитоплазматической, щелочерастворимой фракций белков листьев, а также стромальной фракции белков хлоропластов листьев [14-16].

Использованная модельная система клонов картофеля позволила исследовать последствия смешанной X- и L-инфекции, а также взаимовлияние данных вирусов на уровне белковых спектров растений. В частности, восприимчивые к X- и L-вирусам клоны в ряде случаев обнаруживали в своих белковых спектрах дополнительные по сравнению с восприимчивыми только к одному из вирусов клонами полипептиды, которые, по всей вероятности, способствуют осуществлению смешанной X-/L-вирусной инфекции. Помимо этого, методом иммуноблоттинга удалось продемонстрировать, что у X+L+ клонов наблюдается повышенная экспрессия белков, кодируемых обоими вирусами. Как видно на рис. 1А, в спектрах восприимчивых к X- и L-вирусам клонов экспрессия белка оболочки ХВК заметно выше, по сравнению с восприимчивым только к X-вирусу. Аналогично, иммуноблоттинг с антителами против ЛВК (рис. 1Б) показал, что количество белков вируса скручивания листьев картофеля больше у (X+L+) клона, чем у (X-L+) клона. В ряде фракций растений отдельных генотипов некоторые белки ВСЛК присутствуют только у восприимчивого к двум ВК клонов.

В свою очередь, электрофорез и иммуноблоттинг с ПКК против ХВК кислоторастворимой и щелочерастворимой фракций (рис. 2) показал, что белки ХВК (в особенности белок оболочки вируса с М.м. 25 kDa) представлены в спектре клона восприимчивого только к ХВК в большем количестве, чем в спектре X+L+ клона, восприимчивого к двум ВК (рис. 3). Аналогичные данные были получены при анализе этих фракций клонов с генотипами других сортов.

При этом интересная картина наблюдалась при изучении стромальной фракции белков хлоропластов листьев исследуемых клонов. Известно, что хлоропласты активно подвергаются воздействию вирусной инфекции; в ряде случаев продемонстрировано участие мембран хлоропластов в процессе репликации ряда вирусов. С целью выяснения роли белков хлоропластов в

процессах устойчивости и восприимчивости растений картофеля к X-/L-вирусной инфекции, а также определения их суборганельной локализации, мы проводили ступенчатое фракционирование белков хлоропластов листьев на мембраносвязанную и стромальную фракции родственных клонов картофеля, и их электрофоретический анализ.

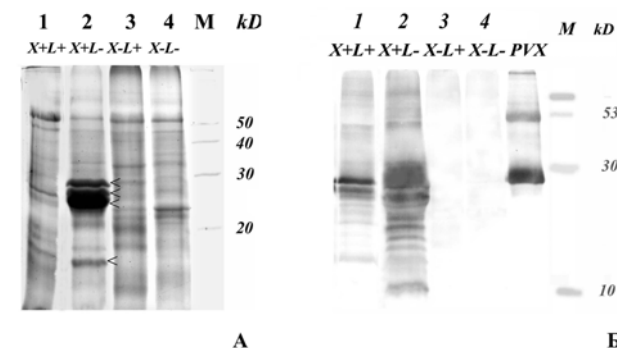


**Рис. 1.** Иммуноблоттинг с ПКА против ХВК (А) и ВСЛК (Б) белков цитоплазматической фракции клонов сортов Явар (1-4) и Аксамит (5-8).

- 1, 5 (X+L+) – клон восприимчивый к X- и L-вирусам;  
 2, 6 (X+L-) – клон восприимчивый к X- и устойчивый к L-ВК;  
 3, 7 (X-L+) – клон устойчивый к X- и восприимчивый L-ВК;  
 4, 8 (X-L-) – клон устойчивый к обоим ВК.  
 М – маркерные белки.

Аналогичные результаты были получены в 3-х независимых сериях экспериментов. Положительным контролем служили очищенные препараты X-(PVX) L-(PLRV) ВК.

Электрофорез белков стромальной фракции хлоропластов родственных клонов ранее позволил выявить ряд количественных и качественных различий между их белковыми спектрами. Иммуноблоттинг с антисывороткой против ХВК и ВСЛК позволил дифференцировать белки вирусов и белки растения-хозяина. В таблице 1 представлены полипептиды, по которым был обнаружен полиморфизм между спектрами родственных клонов. Представленные полипептиды одновременно являются общими для клонов с определенной степенью устойчивости генотипов 3-х сортов.



**Рис. 2.** Электрофоретическое разделение в 12,5% ПААГ (А) и иммуноидентификация с ПКА против ХВК (Б) белков кислоторастворимой фракции клонов сорта Аксамит.

А. Белки окрашены Coomassie R-250. Б. Положительным контролем служили очищенные препараты ХВК.

- 1 (X+L+) – клон восприимчивый к X- и L-вирусам;  
 2 (X+L-) – клон восприимчивый к X- и устойчивый к L-ВК;  
 3 (X-L+) – клон устойчивый к X- и восприимчивый L-ВК;  
 4 (X-L-) – клон устойчивый к обоим ВК. М – маркерные белки.  
 Аналогичные результаты были получены в 3 независимых сериях экспериментов.

Полученные данные в 3-х независимых экспериментах дают основание предполагать, что обнаруженные у родственных клонов с различной степенью устойчивости/восприимчивости к вирусам различных генотипов полипептиды являются геномными маркерами устойчивости (М.м. ~41; 26,5; 22,2; 18,4 kDa) либо восприимчивости (М.м. ~117,7; 37, 24 kDa) к двум вирусам. Более того, на основании полученных результатов, были обнаружены маркеры состояния восприимчивости у растений картофеля к комплексу вирусов (М.м. ~14; 19,8; 23 kDa) и отдельно к ХВК: М.м. ~20,8; 30; 35 kDa.

Для данной фракции также было установлено, что экспрессия белков вируса скручивания листьев наблюдается только у растений восприимчивых к обоим вирусам или более интенсивна у них. Анализ полученных данных по стромальной фракции

белков хлоропластов также подтверждает факт усиления патогенного влияния ВСЛК X-вирусом.

Таблица 1

**Полиморфизм стромальной фракции хлоропластов листьев клонов с контрастной устойчивостью/восприимчивостью с генотипами сортов Явар, Альтаир, Аксамит (предполагаемые геномные маркеры)**

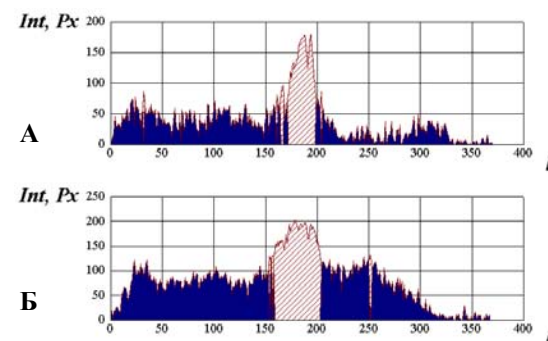
Rf	M, kDa		X+L+	X+L-	X-L+	X-L-
	M	m				
0,11	117,7**	±0,9	+	+	+	-
0,4	41,2**	±0,4	-	-	-	+
0,46	37**	±0,4	+	+	+	-
0,49	35,1***	±0,2	+	+	-	-
<b>0,57</b>	<b>30,1***</b>	<b>±0,2</b>	+	++	-	-
0,66	26,5**	±0,1	-	-	-	+
<b>0,7</b>	<b>25**</b>	<b>±0,1</b>	+	++	-	-
<b>0,72</b>	<b>23**</b>	<b>±0,4</b>	+	-	-	-
0,79	20,8*	±0,2	+	+	-	-
0,82	19,8**	±0,3	+	-	-	-
0,85	18,4*	±0,1	-	-	-	+
0,95	14,3**	±0,4	+	-	-	-

*Примечание.* \*\* – полипептиды, обнаруженные у клонов двух генотипов; \*\*\* – полипептиды, свойственные клонам трех исследованных генотипов. Жирным шрифтом обозначены вирусные белки, идентифицированные Вестерн-блоттингом.

**Rf** – относительная электрофоретическая подвижность; **M** – среднее значение молекулярной массы, определенное в 3 независимых экспериментах; **m** – ошибка среднего. «+» – присутствие полипептида в спектре; «-» – отсутствие полипептида в спектре; «++» – повышенная экспрессия полипептида.

Исследования клубневого материала зараженных растений выявили ряд отличий в белковых спектрах хлорофиллсодержащего слоя клубня этих растений по сравнению с незараженными. Резистентные инфицированные клоны по сравнению с интактными растениями экспрессировали дополнительные полипептиды с М.м. ~76, 68, 64 и 36 kDa, которые можно считать маркерами индуцированной устойчивости картофеля к

X- и L-ВК. При этом полипептиды ~89, 83, 72 и 49 kDa не обнаруживались в спектрах инфицированных устойчивых растений, по сравнению с устойчивым контрольным растением. Поскольку экспрессия данных полипептидов подавляется при инфицировании ХВК и ВСЛК, мы сделали вывод об участии этих белков в конститутивных защитных реакциях растения на смешанную ВСЛК/ХВК инфекцию. Дополнительно, при инфицировании восприимчивых клонов вирусами X- и L-, в спектрах восприимчивых клонов были обнаружены полипептиды с М.м. ~82, 78, 70 и 36 kDa. Мы предполагаем, что данные белки усиливают патологический эффект X- и L-ВК в клетке растения-хозяина. В дальнейшем предполагается провести более детальный анализ этих данных и дальнейшие исследования с использованием искусственного заражения, что, вероятно, облегчит определение роли каждого вируса в отдельности при смешанной инфекции.



**Рис. 3.** Сравнительный денситометрический анализ белков ХВК по результатам иммуноблоттинга с ПКА против ХВК клона восприимчивого к ХВК и ВСЛК (А) и клона восприимчивого к ХВК и устойчивого к ВСЛК (Б) с генотипом сорта Аксамит. *l* – длина пробега белка; специфическое связывание наблюдается в области 25 kDa.

Таким образом, анализ проведенных исследований по изучению взаимовлияния смешанной ХВК/ВСЛК инфекции и конститутивных механизмов защиты и статуса восприимчивости у

клонов с различной степенью устойчивости позволил нам заключить, что одновременное инфицирование X-/L-вирусами сопровождается взаимоусилением патогенного эффекта обоих вирусов на физиологические процессы растения-хозяина, что проявляется на белковом уровне в присутствии дополнительных (невирусных) полипептидов в белковых спектрах клонов, восприимчивых к обоим вирусам, по сравнению с восприимчивыми только к одному из них.

На основании данных иммуноблоттинга подтверждается, что X-вирус картофеля является вирусом-помощником для флоэмноограниченного вируса скручивания листьев картофеля и способствует его транспорту из флоэмы в мезофилл листа. При этом, повышенная экспрессия белков ХВК у клонов восприимчивых только к этому вирусу, по сравнению со спектрами X+L+ клонов дает основание предполагать, что ЛВК конкурирует с ХВК за транспортный белок, и таким образом снижает накопление ХВК в клетках растения-хозяина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Амбросов А.Л. Вирусные болезни картофеля и меры борьбы с ними. Мн.: Наука и техника, 1975. 208 с.
2. Verchot J., Angell S.M., Baulcombe D.C. In vivo translation of the triple gene block of potato virus X requires two subgenomic mRNAs // J. Virol.– 1998.– Vol. 72, №10.– P. 8316-8320.
3. Mayo M.A., Robinson D.J., Jolly C.A., Hyman L.J. Nucleotide sequence of potato leafroll luteovirus RNA // Gen. Virol.– 1989.– Vol. 70, Pt. 5.– P. 1037-1051.
4. Carrington J.C., Kasschau K.D., Mahajan S.K., Schaad M.C. Cell-to-cell and long-distance movement of viruses in plants // Plant Cell.– 1996.– Vol. 8. – P. 1669-1681.
5. Ebel J., Sheel D. Signals in host-parasite interactions // In: The Mycota; – Vol. V. Plant Relationships, Part A., Edited by Carroll G.C., Tudzynski P. Berlin: Springer-Verlag. 1997.– P. 85-105.
6. Hammond-Kosach K.E., Jones J.D.G. Plant disease resistance genes// Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.– 1997.– Vol. 48.– P. 575-607.
7. Carrington J.C., Whitham S.A. Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies // Current Opin. Plant Biol. 1998. –Vol. 1, –P. 336-341.

8. Палилова А.Н., Даниленко Н.Г. Способ оздоровления селекционных сортов картофеля от заражения X-вирусом. 1992. М. Авт. свид. №1745161.
9. Палилова А.Н. Механизмы взаимоотношений растение-патоген при вирусном патогенезе // Проблемы экспериментальной ботаники: Купревические чтения / Под. ред. В.И. Парфенова. Мн., 1998.- С. 59-72.
10. Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж. и др. Антитела. Методы / Под. Ред. Кэтти Д. // М.: Мир. 1991.– Т. 1. 287 с.
11. Сафонов В.И., Сафонова М.П. Исследование белков и ферментов растений методом электрофореза в полиакриламидном геле // В кн.: Биохимические методы в физиологии растений. –М.: Наука.– 1971. – С. 113-119.
12. Гавриленко В.Ф., Ладыгина М.Е., Хандобина Л.М. Большой практикум по физиологии растений. Фотосинтез. Дыхание / Под. ред. Б.А. Рубина.- М: Высшая школа, 1975. –С. 194-200.
13. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature (Lond).– 1970.– Vol. 227.– P. 680- 685.
14. Власова А.Б., Палилова А.Н. Полиморфизм легкорастворимых белков кислой фракции у родственных клонов *Solanum tuberosum*, контрастных по устойчивости к X- и L-вирусам картофеля // Клеточные ядра растений – экспрессия и реконструкция: Темат. сб. по материалам I Региональной науч. конф., Минск, 28-29 мая 2001 г. / НАН Б. Центральный ботанический сад НАН Б. –Минск. 2001. – С. 47-54.
15. Власова А.Б., Палилова А.Н. Родственные клоны *Solanum tuberosum* контрастные по устойчивости к X- и L-вирусам картофеля выявляют полиморфизм белков стромальной фракции хлоропластов // Генетика и селекция в XXI веке: Материалы VIII Съезда генетиков и селекционеров Республики Беларусь, Минск, 23-25 июля 2002 г./ Белгосуниверситет.– Минск,- 2002.- С. 20-21.
16. Власова А.Б., Палилова А.Н. Белки цитоплазматической фракции клонов *Solanum tuberosum*, отличающихся устойчивостью к X- и L-вирусам картофеля // Укр. Биох. Журнал. 2002. –Т. 74, №46 (2). / Спец. выпуск по материалам IX Съезда биохимического общества Украины, Черновцы, 1–2 октября 2002.– С 66-67.