

В. А. КНЯЗЕВ, Д. В. ЛИПСИЦ

БЕЛКОВЫЕ ИНГИБИТОРЫ ВИРУСА X В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ

(Представлено академиком А. И. Опариным 21 XII 1970)

Изучение механизма устойчивости растений к фитопатогенным вирусам находится еще на начальном этапе. Интересным направлением является исследование веществ, обладающих противовирусной активностью ^(1,2). В последнее время в тканях устойчивых растений были обнаружены ингибиторы белковой природы ⁽³⁻⁶⁾, в том числе в картофеле ⁽⁷⁻⁹⁾. Руководствуясь общими представлениями о роли белковых веществ в иммунитете растений ⁽¹⁰⁾, мы решили не только исследовать ингибиторы в интактных безвирусных растениях сортов картофеля, различающихся по устойчивости к вирусу X, но и изучить их динамику в тканях после заражения растений этим вирусом.

Работу проводили с иммунными формами картофеля (сорта Сафир и Сако, сеянец 41956), сортом Катриона, проявляющим сверхчувствительность при заражении, сортом Лорх, обладающим определенной полевой устойчивостью, и высоковосприимчивым к вирусу X сортом Ульяновский. Безвирусные растения выращивали в марлевых домиках — изоляторах, осуществляя периодически необходимый вирусологический контроль.

Изучение ингибирующей активности сока листьев по отношению к вирусу X проводили в фазе 3—4 листьев, бутонизации и цветения. Для исследований брали листья среднего яруса, ручным прессом выжимали сок и центрифугировали его 15 мин. при 7000 об/мин.

Затем, следуя методике ^(11,12), брали 0,5 мл сока из листьев картофеля, 0,03 мл инфекционного сока и 0,47 мл 0,01 M трис-HCl-буфера, pH 7,6 (опытная смесь). В контроле было 0,97 мл буфера и 0,03 мл инфекционного сока. Инфекционный сок получали из листьев зараженных вирусом X растений *Datura stramonium*. Ручным прессом выжимали сок, центрифугировали его 15 мин. при 12000 об/мин (на холоду), после чего разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:10 и использовали в опытах. Указанные смеси перемешивали и помещали на 4 часа в холодную камеру, при температуре +4°. Через 4 часа 10 половинок листьев *Gomphrena globosa* натирали опытной смесью, другие 10 половинок — контрольной. Через 4—5 дней подсчитывали число некрозов на половинках листьев (общее и на единицу площади). На основании этих подсчетов определяли степень

Таблица 1

Степень снижения инфекционности вируса X соком из листьев различных сортов картофеля

Сорт	Характеристика сорта	Фаза 3—4 листьев	Бутонизация	Цветение
Ульяновский	Восприимчивый	39,1	44,2	47,7
Лорх	Полевая устойчивость	44,0	54,7	65,2
Катриона	Сверхчувствительность	44,5	52,0	70,4
Сеянец 41 956	Иммунный	53,4	63,0	71,7
Сако	Иммунный	55,2	68,0	72,8
Сафир	Иммунный	52,9	71,0	75,9

подавления инфекционности вируса X по формуле:

количество некрозов в опыте $\times 100$

100 —

количество некрозов в контроле

Полученные результаты представлены в табл. 1.

Как видно, способность сока из листьев определенного сорта подавлять инфекционность вируса X находится в прямой зависимости от степени устойчивости этого сорта к вирусу. Эта способность меняется в течение периода вегетации: она наименьшая в фазе 3—4 листьев и наиболее высокая в период цветения растений.

После этого было прослежено влияние заражения вирусом X на содержание ингибирующих веществ в тканях. Для этой цели через 20 дней после появления всходов одну группу растений каждого сорта заражали вирусом X, соответствующие листья второй контрольной группы натирали со-

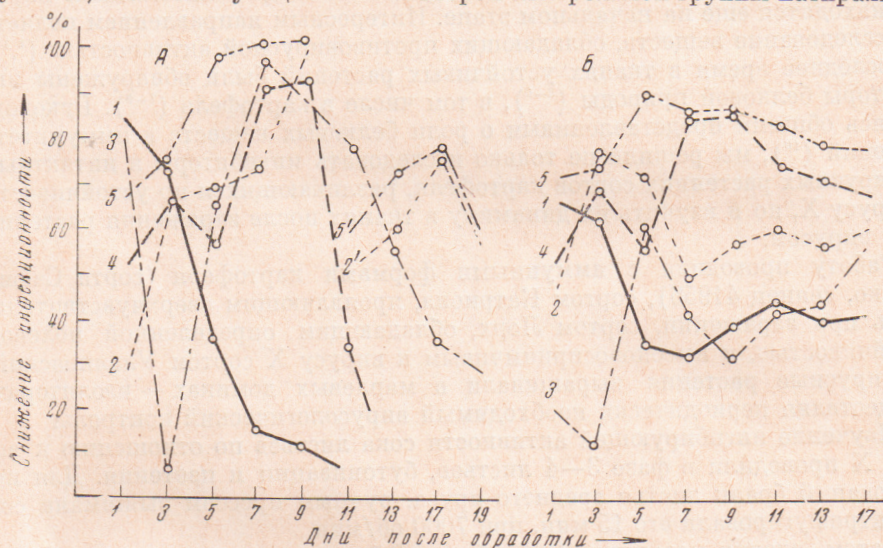


Рис. 1. Подавление инфекционности вируса X соком из листьев картофеля, близлежащих к зараженным вирусом (А) и близлежащих к натертым здоровым соком (В). 1—Ульяновский, 2—сеянец 41 956, 3—Катриона, 4—Лорх, 5—Сафир. Кривые 2'—с. 41 956 и 5' показывают ингибирующую активность половинного объема сока (0,25 мл) из листьев испытуемых растений

ком здоровых растений *Datura stramonium*, третью оставляли без обработки. Здоровый и инфекционный сок втирали в листья среднего яруса. Через 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 17, 19 дней брали для исследования листья, близлежащие к инокулированным, а также аналогичные листья здоровых растений. Определяли ингибирующую способность сока. Примечательно (рис. 1), что в ответ на заражение вирусом X в листьях растений устойчивых сортов, близлежащих к зараженным, значительно увеличивалось содержание ингибитора (ингибиторов) и повышалась способность их сока подавлять инфекционность вируса. Ингибирующая активность достигала максимума на 9 день после заражения и сохранялась в последующие дни. Сок иммунных образцов в это время уже полностью подавлял появление некрозов на листьях растения-индикатора. После обработки доли листа здоровым соком *Datura stramonium* во всех случаях содержание ингибирующих веществ было близким к их содержанию в здоровых тканях.

Накопление ингибирующих веществ в динамике после заражения согласуется в общем с типом устойчивости отдельных сортов к вирусу X. У иммунных сортов картофеля синтез ингибирующих веществ происходил значительно быстрее, чем у менее устойчивых; антивирусное действие сока из листьев иммунных растений оказывалось более стойким.

Сок из листьев здоровых растений сорта Сафир, обладающий ингибирующей активностью, был использован для предварительного изучения отдельных свойств ингибиторов. Оказалось, что ингибирующие вещества термостабильны, не выпадают в осадок при центрифугировании; сок сохраняет свои свойства после диализа и теряет их после осаждения белка трихлоруксусной кислотой.

Из сока листьев здоровых растений и листьев, близлежащих к заражавшимся, через 9 дней после заражения, путем ступенчатого высаливания сернокислым аммонием, были выделены фракции белка, обладающие наибольшей ингибирующей активностью. Ступенчатое высаливание вели до 70% насыщения с интервалом в 10%. Полученные осадки растворяли в 0,01 М трис-HCl-буфере pH 7,6 и подвергали диализу против того же буфера в течение ночи.

В результате испытания активности фракций (после предварительного их выравнивания по концентрации) оказалось, что в случае белка из листьев здоровых растений наибольшим ингибирующим действием обладают фракции, получаемые при насыщении 40—50 и 50—

60%; в случае белка из сока листьев, близлежащих к заражавшимся, наибольшую ингибирующую активность имеют фракции, получаемые при 50—60 и 60—70% насыщения сернокислым аммонием (рис. 2).

Затем были собраны фракции белка, выпадающие в осадок при насыщении сока сернокислым аммонием в пределах 40—70%, объединены и изучены методом колоночной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе («Реанал» Будапешт).

В результате фракционирования были получены доказательства наличия активной реакции тканей устойчивого сорта на заражение вирусом Х, проявившейся в некоторой перестройке фракционного состава белка и появлении нового белкового компонента в листьях, близлежащих к заражавшимся.

В дальнейшем была исследована ингибирующая активность выделенных белковых фракций. С этой целью получаемые на коллекторе порции элюата, соответствующие каждому пику, объединяли, диализовали против воды и лиофильно высушивали. Навески сухого препарата, по 20 мг, растворяли в равных объемах 0,01 М трис-HCl-буфера, pH 7,6, и использовали для определения ингибирующей активности фракций.

Полученные данные показывают (табл. 2), что ингибирующая активность как бы рассредоточена по нескольким фракциям, получаемым в процессе колоночного фракционирования. Пока трудно с уверенностью сказать, происходит ли это в результате наличия ингибирующей активности у нескольких различных белков или же один активный белок в той или иной степени распределяется по фракциям. Отчетливо видно, что после за-

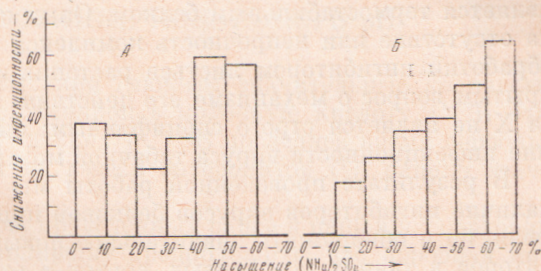


Рис. 2. Ингибирующая активность фракций, полученных при ступенчатом высаливании белка из сока здоровых листьев сорта Сафир (А) и листьев, близлежащих к заражавшимся, через 9 дней после заражения (Б)

Таблица 2

Ингибирующая активность фракций, полученных после колоночного фракционирования белка, осажденного из сока листьев (NH₄)₂SO₄ (40—70% насыщения, сорт Сафир)

Номера фракций	Степень сниженной инфекционности	
	лист здоровый	лист, близлежащий к заражавшемуся
0	—	—
1	—	—
2	45,5	40,7
3	52,0	60,0
4	38,0	43,3
5	—	75,0

ражения ингибирующая активность значительно увеличивается и изменяется распределение этой активности по фракциям белка. Эти данные, возможно, указывают на то, что белковые ингибиторы, возникающие в тканях устойчивого сорта после заражения, не идентичны тем, которые содержатся в интактных тканях.

Полученная после колоночной хроматографии фракция с наибольшей ингибирующей активностью была подвергнута исследованию. Качественные реакции показали наличие белка и едва заметные примеси нуклеиновых кислот и углеводов. Ингибитор был термостабильным, высаливался сернокислым аммонием, адсорбировался на ДЭАЭ-целлюлозе, подвергался частичному протеолизу трипсином. Все это позволяет заключить, что он является термостабильным белком. Опыт с центрифугированием указывал на отсутствие или непрочность комплекса ингибитор — вирус. Результаты обработки ингибитором листьев растения-индикатора, оставляют пока открытым вопрос о механизме его действия. Интересно, что ингибитор вируса Х не является строго специфичным; он вызывал значительное снижение инфекционности вируса табачной мозаики (в.т.м.).

В результате проведенной работы мы смогли не только подтвердить наличие ингибиторов вирусов белковой природы в тканях растения картофеля, но и обнаружить значительное повышение содержания таких ингибиторов в тканях устойчивых сортов в ответ на заражение вирусом Х; показано также влияние заражения на фракционный состав белков в листьях устойчивого растения. Все это указывает на существенную роль белкового метаболизма растения в его вирусоустойчивости.

Научно-исследовательский институт
картофельного хозяйства
Московская обл.

Поступило
18 XII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. C. Bawden, *Advances in Virus Res.*, 2, 31 (1954). ² Д. Д. Вердеревский, *Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям*, Кишинев, 1968.
³ N. C. Crowley, *Austr. J. Biol. Sci.*, 8, 1, 56 (1955). ⁴ М. Я. Молдован, *Матер. II Всесоюзн. симпозиума по электронной микроскопии*, Киев, 1967, стр. 146.
⁵ B. Kassanis, A. J. Kleczkowski, *Gen. Microbiol.*, 2, 2, 143 (1948). ⁶ M. Zaitlin, A. Siegel, *Phytopathol.*, 53, 2, 224 (1963). ⁷ W. J. Hooker, W. S. Kim, *Phytopathol.*, 52, 7, 688 (1962). ⁸ E. Jermoljev, L. Albrechtova, *Biol. Plant.*, 7, 1, 65 (1965). ⁹ F. Nienhaus, *Phytopathol. Zs.*, 43, 2, 183 (1961). ¹⁰ Д. В. Липсиц, *С.-х. биол.*, 4, 5, 661 (1969). ¹¹ Н. Н. Дьяченко, *Агробиология*, 6, 912 (1959).
¹² E. Jermoljev, J. Brčak, *Nachr. Deut. Pfl. Schutzdien.*, 17, 4, 55 (1965).