

Б. А. РУБИН, Е. Р. КАРТАШОВА, Е. Ю. ЗОЛУТУХИНА

**ГИБРИДНЫЕ ФОРМЫ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ
FUSARIUM OXYSPORUM F. SP. VASINFECTUM И ХЛОПЧАТНИКА**

(Представлено академиком А. С. Спириным 4 III 1975)

Инфицированное растение представляет собой противоречивое единство разнообразных форм взаимодействий систем, затрагивающих практически все уровни внутренней организации растения и патогена. Поиск оптимальных состояний внутренней среды требует от инфицированного растения перестройки жизненно важных центров, включая генный аппарат, энергодающие системы, становление новых элементов координации и последовательности многочисленных процессов, связанных с органами, органоидами, «ферментативными ансамблями» и т. д. Наиболее характерной ответной растительной клетки на инфекцию мы считаем обнаруженную нами способность иммунных форм растений к синтезу *de novo* белков-ферментов и образованию функционально активных органоидов — рибосом и митохондрий (¹, ²). Специфические изозимы, синтезированные *de novo* в инфицированном растении, должны рассматриваться именно как результат взаимодействия растения-хозяина и возбудителя, как продукт, образование которого индуцируется взаимодействием партнеров. Согласно Стаманну, при установлении непосредственного взаимодействия ферментных систем патогена и растения-хозяина возможен обмен между субъединицами одноименных ферментов в районе непосредственной близости от места заражения. Этот процесс сопровождается образованием гибридного фермента со свойствами, отличными от свойств исходных молекул фермента (³, ⁴). Экспериментальных исследований, подтверждающих данную гипотезу, не проведено.

В настоящей работе предпринята попытка выяснить принципиальную возможность образования гибридных форм ферментов, принадлежащих растению-хозяину и патогену, а также установить зависимость этого процесса от биологической совместимости партнеров. В отличие от работ Стаманна, объектом наблюдения которого служили гомогенаты патогена и растения-хозяина, обладающие каталитической активностью, наша работа проведена на изолированных изозимах современными методами исследования (изотопный анализ и иммуноэлектрофорез).

Индивидуальные изозимы малатдегидрогеназы (МДГ) из корней хлопчатника (R_f 0,39) и мицелия гриба вирулентного штамма (R_f 0,65) и авирулентного штамма (R_f 0,61) выделялись при помощи препаративного электрофореза в полиакриламидном геле (⁵) из очищенных фракционированием $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и хроматографией на сефадексе G-200 препаратов МДГ (⁶). Выращивание хлопчатника сорта 8763-И и двух штаммов моноспоровой культуры гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, вирулентного № 15(155904) и авирулентного № 61(619123) к сорту хлопчатника 8763-И, проводили согласно работе (⁷).

Получение гибридных форм изозимов фермента осуществляли путем замораживания и оттаивания смеси изозимов МДГ гриба и растения в 1 *M* NaCl с последующим диализом против Na—K-фосфатного буфера pH 8,0 ⁽⁸⁾.

Диссоциированную и реассоциированную смесь анализировали электрофоретически. Электрофореграммы проявляли на активность МДГ нитросиним тетразолием, на белок — амидочерным ⁽⁹⁾. В изотопном анализе при гибридизации использовались изозимы МДГ гриба, меченные по углероду ⁽⁷⁾. Определение радиоактивности фракций белка, полученных на электрофореграммах, проводили в диоксановой сцинтилляционной смеси

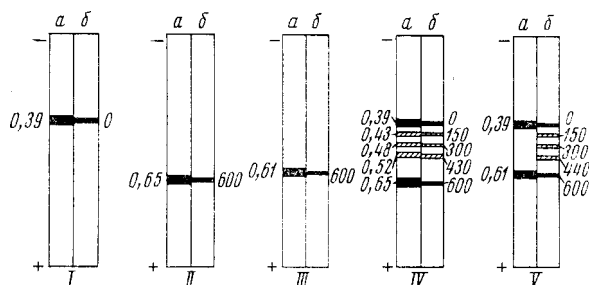


Рис. 1. Электрофореграмма изозимов МДГ. *a* — проявление на активность МДГ; *b* — проявление на белок. Числа справа — значения радиоактивности фракций (имп/мин на 100 мкг белка), числа слева — значения R_f . *I* — корни хлопчатника, *II* — патогенный штамм, *III* — авирулентный штамм, *IV* — патогенный штамм+растение, *V* — авирулентный штамм+растение

для водорастворимых проб ⁽¹⁰⁾. Для иммунодиффузионных методов отдельные изозимы, выделенные электрофоретически, лиофилизировали и хранили при температуре — 4°. Перед опытом белок растворяли в физиологическом растворе pH 7,2. При получении иммунных сывороток изозимы МДГ, используемые в гибридизации, вводились кроликам. В первую инъекцию животным вводили внутривенно по 20 мг белка с адъювантом Фрейнда. Последующие инъекции проводили с 7-дневными интервалами внутримышечно без адъюванта. Количество вводимого белка увеличивали

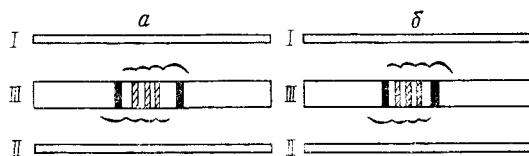


Рис. 2. Иммуноэлектрофорез гибридизованных смесей. *a* — патогенный штамм+растение, *b* — авирулентный штамм+растение, *I* — сыворотка к изозиму МДГ гриба (R_f 0,65 и 0,61), *II* — сыворотка к изозиму МДГ растения (R_f 0,39), *III* — схема электрофореграммы геля, проявленного на белок

с 15 до 30 мг. Через 60 дней после первой инъекции у животных брали по 30 мл крови. Сыворотку получали стандартным методом ⁽¹¹⁾ и хранили в замороженном состоянии. Сыворотки, полученные после двух циклов иммунизации и используемые в опытах, имели титр антител 1024. Для исследования антигенных свойств исходных изозимов и новых молекулярных форм МДГ использовали встречную диффузию в агаре и иммуноэлектрофорез ^(12, 13).

При электрофорезе диссоциированных и реассоциированных смесей изозимов МДГ вирулентного штамма и растения наблюдали образование новых форм белка, обладающих каталитической активностью, тогда как в случае авирулентного штамма новые формы белка не обладали малатдегидрогеназной активностью (рис. 1). Для проверки того, что новые формы белка образуются вследствие рекомбинации изозимных структур МДГ патогена и растения, а не являются результатом распада исходных изозимов, ставились контрольные опыты, в которых диссоциации и реассоциации подвергались исходные изозимы МДГ растения и патогена отдельно. В этих случаях при электрофорезе реассоциированных изозимов проявлялись только исходные полосы белка с теми же значениями R_f . Мы не наблюдали также появления новых белковых полос, если после проведения диссоциации и реассоциации каждого из изозимов отдельно смешивали их перед проведением электрофореза. Данные опыты позволяют полагать, что новые белковые фракции появляются в результате рекомбинации изозимов МДГ патогена и растения.

Для исследования структуры новых белковых фракций мы ввели изотоп C^{14} в исходные изозимы МДГ гриба. На электрофореграммах гибридованных смесей радиоактивность распределялась между исходной полосой МДГ гриба и новыми белковыми формами (рис. 1). Содержание C^{14} по мере увеличения R_f новой белковой фракции возрастало на $1/4$ от радиоактивности исходной полосы гриба. Тетрамерная структура изучаемых молекул МДГ и характер изменения содержания C^{14} в новых фракциях белка свидетельствуют о том, что они включают субъединицы фермента патогена.

Иммунохимические исследования показали, что в структуре новых форм белка, наряду с субъединицами МДГ гриба, присутствуют структурные элементы изозима МДГ растения. Для предварительного исследования антигенных свойств исходных изозимов была поставлена серия гомологичных и гетерологичных реакций преципитации в агаре. Полосы преципитации образовывались только в гомологичных реакциях. Следовательно, в структуре изозимов, взятых для гибридизации, не было общих антигенных детерминант. Проверка специфичности иммунных сывороток к индивидуальным изозимам, которые использовались для гибридизации, проведенная при помощи иммуноэлектрофореза, выявила строгую специфичность антител сыворотки к своим антигенам. При электрофорезе суммарной МДГ гриба или растения и последующей иммунодиффузии в агаре полоса преципитации образовывалась только в том участке геля, где находился изозим МДГ, использованный для иммунизации. Образование новыми молекулярными формами белка полос преципитации с сыворотками к изозимам МДГ и гриба и растения свидетельствует о наличии в структуре этих белков антигенных детерминант, свойственных обоим исходным формам МДГ (рис. 2).

Таким образом, в наших опытах имело место образование новых форм белка при гибридизации изозимов МДГ патогена и растения-хозяина, состоящих из субъединиц исходных форм. Эти молекулярные формы обладали ферментативной активностью в случае рекомбинации субъединиц изозима МДГ вирулентного штамма гриба с субъединицами изозима МДГ растения-хозяина и не обладали ферментативной активностью в случае рекомбинации субъединиц изозима МДГ авирулентного штамма с субъединицами МДГ растения. Мы полагаем, что это связано со структурными различиями фермента у исследуемых штаммов гриба, отражающими их вирулентные свойства и свидетельствующими о различной их совместимости с растением-хозяином.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Б. А. Рубин, С. х. биол., т. 4, № 5, 643 (1969).
- ² Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина, В. А. Аксенова, Сб. Функциональная биохимия клеточных структур, 1970, стр. 349
- ³ М. А. Stahmann, W. Woodbury, Biochemical Regulation in diseased of Injury. The Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 1968.
- ⁵ R. C. Staples, M. A. Stahmann, Phytopathology, v. 54, 7, 760 (1964).
- ⁵ Э. Маурер, Дискэлектрофорез, М., «Мир», 1971.
- ⁶ S. A. O'Sullivan, R. T. Wedding, Plant Physiology, v. 49, 2, 117.
- ⁷ Б. А. Рубин, Е. Р. Крашова, Е. Ю. Золотухина, ДАН, т. 218, № 5, 1245 (1974).
- ⁸ O. P. Chilson, L. A. Costello, N. O. Kaplan, J. Mol. Biol., v. 10, 2, 343 (1964).
- ⁹ В. П. Сафонов, М. П. Сафонова, Физиол. раст., т. 1, № 2, 174 (1964).
- ¹⁰ Ч. Ванг, Д. Уиллис, Радиоиндикаторный метод в биологии, М., Атомиздат, 1969.
- ¹¹ Методы вирусологии и молекулярной биологии, М., «Мир», 1972.
- ¹² А. Д. Володарский, В сб.: Методы выделения и исследования белков-компонентов фотосинтетического аппарата, Пущино-на-Оке, 1973.
- ¹³ G. Ir. Fairbanks, C. Levinthal, R. H. Reeder, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 20, 4, 393 (1965).