

Виділення міжклітинних глікобіополімерів з листя надчутливих рослин тютюну, уражених вірусом тютюнової мозаїки

О. Г. Коваленко, А. М. Кириченко, Т. А. Телегеєва

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

В апопласті уражених вірусом тютюнової мозаїки надчутливих рослин тютюну сорту Імунний 580 виявлено акумуляцію міжклітинних глікобіополімерів на ранніх стадіях інфекції (через 1 добу після інокуляції). Методами гель-фільтрації (на біогелі P-10), іонообмінної (на ДЕАЕ-сефардексі А-25) та афінної (на конканавалін А-сефарозі) хроматографії виділено два компоненти, відсутні в контролі. Постулюється участь виявлених компонентів у передачі сигналу від інфікованих клітин здоровим та в ініціації у рослині механізмів локалізації вірусної інфекції та/або розвитку набутої стійкості рослинних тканин до реінфекції.

Ключові слова: вірус тютюнової мозаїки, надчутлива реакція, глікобіополімери, конканавалін А, розподільна та афінна хроматографія.

Вступ. Ураження надчутливих рослин тютюну вірусом тютюнової мозаїки (ВТМ) призводить до значних змін їхнього метаболізму, зокрема, до накопичення у міжклітинному просторі білків і вуглеводів, особливо на ранніх стадіях вірусної інфекції [1]. За допомогою афінної хроматографії на конканавалін А (КонаА)-сефарозі у міжклітинній рідині з листя уражених ВТМ рослин надчутливого сорту тютюну Імунний 580 вже через 1 добу після інокуляції виявлено білково-вуглеводвмісний компонент, відсутній у здорових рослинах, а також в уражених рослинах чутливого мутанта [2]. З огляду на те, що цей компонент утворюється в рослині вже на ранніх стадіях вірусної інфекції, можна вважати, що подібні речовини на відміну від асоційованих з патогенезом білків [3] та індукторів резистентності [4], які виявляються на пізніх етапах інфекції, очевидно, виконують функцію

ініціаторів надчутливої реакції (ІНР). Остання може бути реалізована завдяки специфічній білково-вуглеводній взаємодії з відповідними лектиноподібними рецепторами [5].

Метою цієї роботи було порівняльне вивчення міжклітинних білків і глікобіополімерів (ГБП) здорових та уражених ВТМ чутливих і надчутливих рослин тютюну методом іонообмінної хроматографії та виділення з них КонаА-специфічних ГБП.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень слугували здорові і уражені ВТМ (штам U_1) чутливі (дефіцитний за геном N мутант) та надчутливі до нього рослини тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) сорту Імунний 580, а також напівчутливі рослини *Nicotiana glauca* Hort. Зразки з дослідних і контрольних (оброблених водою) рослин відбирали через 1, 4 і 7 діб після інокуляції. Міжклітинну рідину з листя дослідних і контрольних рослин одержували, як рекомендовано в роботах [1, 2], ліофілізували і використовували за необхідності.

Препарати ГБП, очищені від низькомолеку-

лярних сполук, отримували з ліофілізованої міжклітинної рідини осадженням у присутності етанолу [2] або методом гель-фільтрації. Для цього застосовували препаративну колонку (3 × 30 см) з біогелем P-10 («Bio-Rad Laboratories», США), зрівноважену 0,1 М фосфатним буфером (рН 7,4), що мистив 0,15 М NaCl (ФБС). На колонку наносили 300—800 мг препарату міжклітинної рідини, розчиненого в 5 мл ФБС, та елюювали цим же буфером. Фракції ГБП, що виходили з колонки вільним об'ємом, збирали за допомогою колектора фракцій, об'єднували і концентрували діалізом проти 80 %-го розчину поліетиленгліколю (ПЕГ, 20 кДа). Колонку після гель-фільтрації регенерували 0,05 М боратним буфером, рН 8,8.

Очищені препарати міжклітинної рідини аналізували методом іонообмінної та афінної хроматографії на колонці (1,2 × 11 см) з ДЕАЕ-сефадексом А-25 («Pharmacia», Швеція). Нанесені на колонку препарати елюювали послідовно ФБС та 0,2—2 (лінійний градієнт концентрації) або 2 М NaCl у ФБС. Фракції, що утримувалися іонообмінником, збирали, діалізували проти 0,1 М ФБС, концентрували за допомогою ПЕГ (20 кДа), як зазначено вище, і аналізували на колонці (1,2 × 11 см) з КонА-сефарозою («Лектинотест», Україна) за методом [2]. Для повноти елюції КонА-специфічних ГБП після пропускання 0,1 М ФБС колонку зрівноважували 0,05 мМ α -метил-D-манозидом і витримували упродовж ночі в холодильнику, а відтак десорбовані сполуки елюювали 0,1 М ФБС. Регенерацію колонки здійснювали 0,05 М боратним буфером, рН 8,8, а потім — 1 %-м розчином оцтової кислоти.

Процес хроматографії реестрували за допомогою проточного спектрофотометра Uvicord S-II («LKB», Швеція), сполученого з самописцем КСП-4. Фракції об'ємом 1—2 мл збирали за допомогою колектора Yargo («BioMark, Inc.», Швеція).

Препарати ГБП після осадження етанолом і гель-фільтрації, а також їхні хроматографічні фракції досліджували на наявність білків та вуглеводів, як описано в роботах [1, 2].

Хроматограми ГБП, отримані в автоматичному режимі на ДЕАЕ-сефадексі А-25, аналізували візуально та за визначенням площ під відповідними хроматографічними кривими (S_1 і S_2 , рис. 1), які відносили (у відсотках) до загальної площі хроматограми ($S_1 + S_2$), прийнятої за 100 %. Щоб порівняти відносну кількість кислих ГБП у досліді (Д)

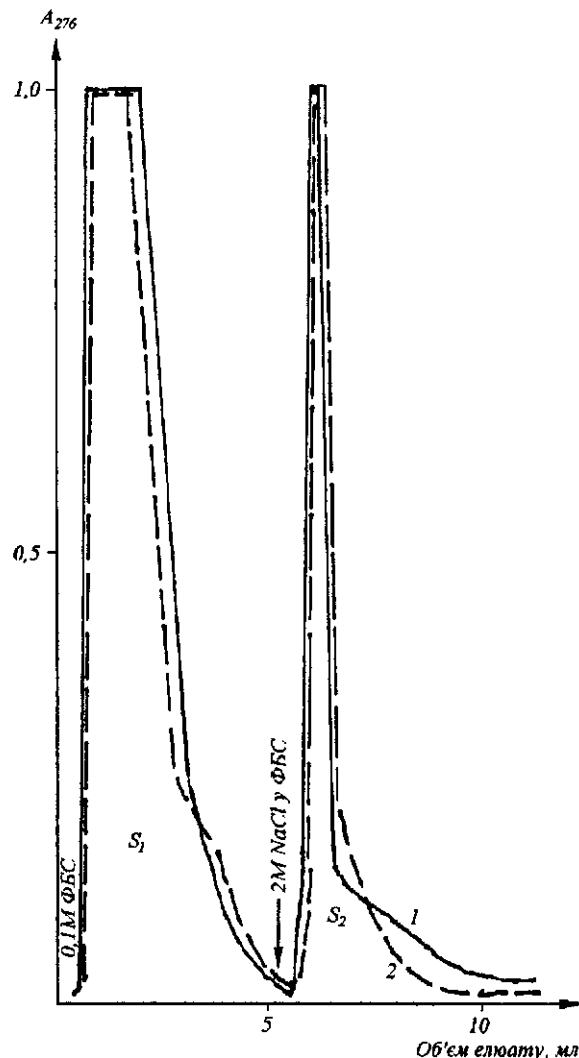


Рис. 1. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-сефадексі А-25 етанольного преципітату міжклітинної рідини, вилученої з листя тютюну сорту Імунний 580, ураженого ВТМ (1) (1-ша доба після інюкаляції) та здорового (2). S_1 та S_2 — площі під відповідними хроматографічними кривими

та контролі (К), визначали відношення (у відсотках):

$$Д/К = 100 \cdot \frac{S_2 : S_1 + S_2 \text{ (у досліді)}}{S_2 : S_1 + S_2 \text{ (у контролі)}}.$$

Результати і обговорення. Спершу аналізували препарати міжклітинної рідини, частково очищені осадженням за присутності етанолу. Результати досліджень показали, що як у здорових рослинах тютюну, так і в рослинах, інфікованих ВТМ, утворюються аніонні біополімери, які можна виявити та препаративно виділити за допомогою іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефадексі.

Вміст аніонних глікобіополімерів у міжклітинній рідині з листя чутливого і надчутливого тютюну, здорового і ураженого вірусом тютюнової мозаїки

День після інюкуляції	Інокулюм	Площа, см ²			(S2/S1 + S2) · 100, %	Д/К*, %
		Пік 1 (S1**)	Пік 2 (S2***)	Загальна (S1 + S2)		
<i>Надчутливий сорт тютюну (Імунний 580)</i>						
1	ВТМ	8,4	8,0	16,4	49	136
1	Вода	15,0	8,3	23,3	36	100
1	ВТМ	4,9	8,3	13,2	63	175
1	Вода	15,0	8,3	23,3	36	100
3	ВТМ	16,1	9,9	26,0	38	73
3	Вода	16,0	17,5	33,5	52	100
3	ВТМ	13,4	16,7	30,1	55	77
3	Вода	7,5	18,0	25,4	71	100
7	ВТМ	27,4	42,0	69,4	61	109
7	Вода	17,0	21,5	38,5	56	100
<i>Чутливий мутант тютюну (сорт Імунний 580)</i>						
1	ВТМ	4,6	5,6	10,2	55	112
1	Вода	9,5	9,3	18,8	49	100
1	ВТМ	4,3	4,4	8,7	51	89
1	Вода	2,7	3,6	6,3	57	100
1	ВТМ	4,9	10,0	14,9	67	100
1	Вода	2,6	52,5	78,5	67	100
3	ВТМ	8,8	15,6	24,4	64	194
3	Вода	18,7	9,4	28,1	33	100
7	ВТМ	14,2	23,5	37,7	62	243
7	Вода	19,0	6,5	25,5	25	100
7	ВТМ	7,9	3,4	10,4	32	356
7	Вода	18,8	1,9	20,7	9	100

Примітка. *Д — дослід, К — контроль; дослідні рослини інюкулювали ВТМ, контрольні — обробляли водою; ** та ***елюювали ФБС, що мистив 0,15 і 2,0 М NaCl відповідно.

Хроматографічні профілі досліджуваних зразків за якісними характеристиками були близькими і склалися з двох кривих, що відповідають речовинам, які не зв'язалися з іонообмінником і елюювалися ФБС низької іонної сили, і речовинам, які зв'язалися з ним і здатні вимиватися буферним розчином підвищеної іонної сили (рис. 1). Причому характер одержаних кривих був майже однаковим незалежно від того, яку концентрацію NaCl використовували для десорбції речовин з іонообмінника — 0,2—2 (лінійний градієнт) або 2 М.

З візуального перегляду хроматограм випливає, що фракції, які вимивалися з колонки елюентом підвищеної іонної сили (2 М NaCl у ФБС),

мають різну інтенсивність поглинання світла (при довжині хвилі 276 нм) залежно від варіанту досліджу. Аналіз хроматограм за визначенням площ під хроматографічними кривими виявив, що вплив ВТМ-інфекції на нагромадження аніонних біополімерів у рослинах тютюну був обумовлений вірусостійкістю останнього (таблиця). Так, у надчутливого сорту Імунний 580 зростання вмісту цих речовин спостерігалось вже на 1-шу добу інфекції, після чого був спад (на 4-ту добу), а потім (на 7-му добу) — нормалізація накопичення аніонних біополімерів. У чутливого мутанта цього сорту, навпаки, ріст синтезу аніонних ГБП мав місце лише на 4-ту і, особливо, на 7-му, але не на 1-шу добу інфекції.

Окрім наведених вище форм тютюну, досліджували здорові та уражені ВТМ рослини *N. sanderae*, характерною реакцією яких на інокуляцію цим вірусом є некротизація інокульованого листа без локалізації інфекції, але з наступним розвитком неспецифічної локальної і системної індукованої стійкості до реінфекції [6]. Зразки міжклітинної рідини, відібрані через 1, 4 та 7 діб після інокуляції рослин цього виду, за хроматографічними характеристиками на ДЕАЕ-сефадексі А-25 у досліді і контролі виявилися майже ідентичними. Цей факт може бути свідченням того, що зазначені зміни в акумуляції аніонних ГБП зумовлені не патологією (некротизацією) тканин, а формуванням у них захисних механізмів.

Таким чином, ВТМ-інфекція по-різному впливає на накопичення кислих ГБП у рослинах тютюну залежно від їхньої вірусостійкості. Різний характер реакції рослин на вірусну інфекцію обумовлений, вірогідно, тим, що у надчутливих рослинах, уражених вірусом, має місце утворення клітинних компонентів, які виконують регуляторні функції [5]. У чутливих же рослинах «гіперсинтезу» піддаються продукти вірусного геному, можливо, транспортний білок або транспортні форми вірусу. Детальне дослідження останніх, безумовно, заслуговує на увагу, але не є завданням цієї роботи.

Згідно з метою досліджень, нам належало порівняти хроматографічні профілі елюції міжклітинної рідини досліді і контролю з тим, щоб виділити ГБП, характерні для ВТМ-інфікованих надчутливих рослин тютюну. На відміну від попередніх дослідів, результати яких представлено вище, для початкового очищення біополімерів використовували не осадження етанолом, а гель-фільтрацію на біогелі Р-10 і для подальших аналізів відбирали високомолекулярну фракцію, що виходила з колонки разом з вільним об'ємом елюента (0,1 М ФБС).

Результати розподільної хроматографії на сефадексі А-25, представлені на рис. 2, показують, що як і в попередніх дослідях, у препаратах міжклітинної рідини з дослідних (через 1 добу після інокуляції) і контрольних рослин виявляються нейтральні речовини, які не затримуються іонообмінником, і речовини, що затримуються ним, хоча профілі елюції дещо відрізняються від попередніх (рис. 1). Фракції, які елюювалися 2 М NaCl у ФБС, збирали, концентрували і хроматографували на колонці з КонА-сефарозою. Аналіз хроматограм

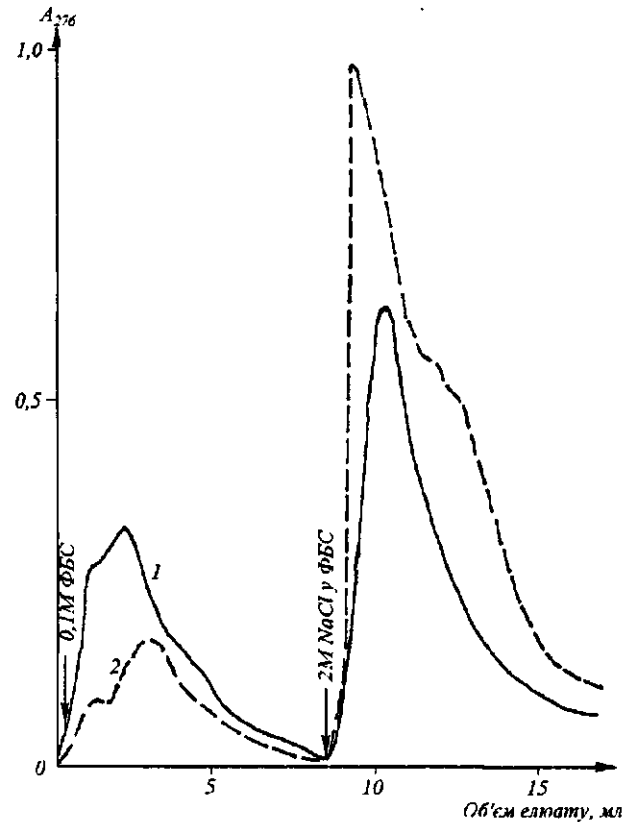


Рис. 2. Іонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-сефадексі А-25 очищеного на біогелі Р-10 препарату з міжклітинної рідини, вилученої з листа тютюну сорту Імунний 580, ураженого ВТМ (1) (1-ша доба після інокуляції) та здорового (2)

показав (рис. 3, а), що дослідні і контрольні зразки міжклітинної рідини, одержані після іонообмінної хроматографії, різняться між собою за компонентним складом. Так, у досліді виявлено принаймні чотири компоненти, які специфічно зв'язалися з лігандом і елюювалися 0,05 М α -метил-D-манозидом у ФБС (піки 1—4), у контролі — лише два компоненти (відсутні піки 2 і 4). Близькі результати одержано нами в процесі афінної хроматографії зразків міжклітинної рідини, очищеної лише за допомогою гель-фільтрації на біогелі Р-10 без додаткового очищення на іонообміннику (рис. 3, б). Це свідчить, з одного боку, про аніонний характер виділених на КонА-сефарозі ГБП, а з іншого, — про можливість спрощення процедури отримання КонА-специфічних ГБП завдяки вилученню стадії іонообмінної хроматографії.

Отримані дані в цілому узгоджуються з результатами попередніх досліджень, які свідчать про виявлення методом афінної хроматографії відсутнього в контролі «додаткового» компонента(ів) у

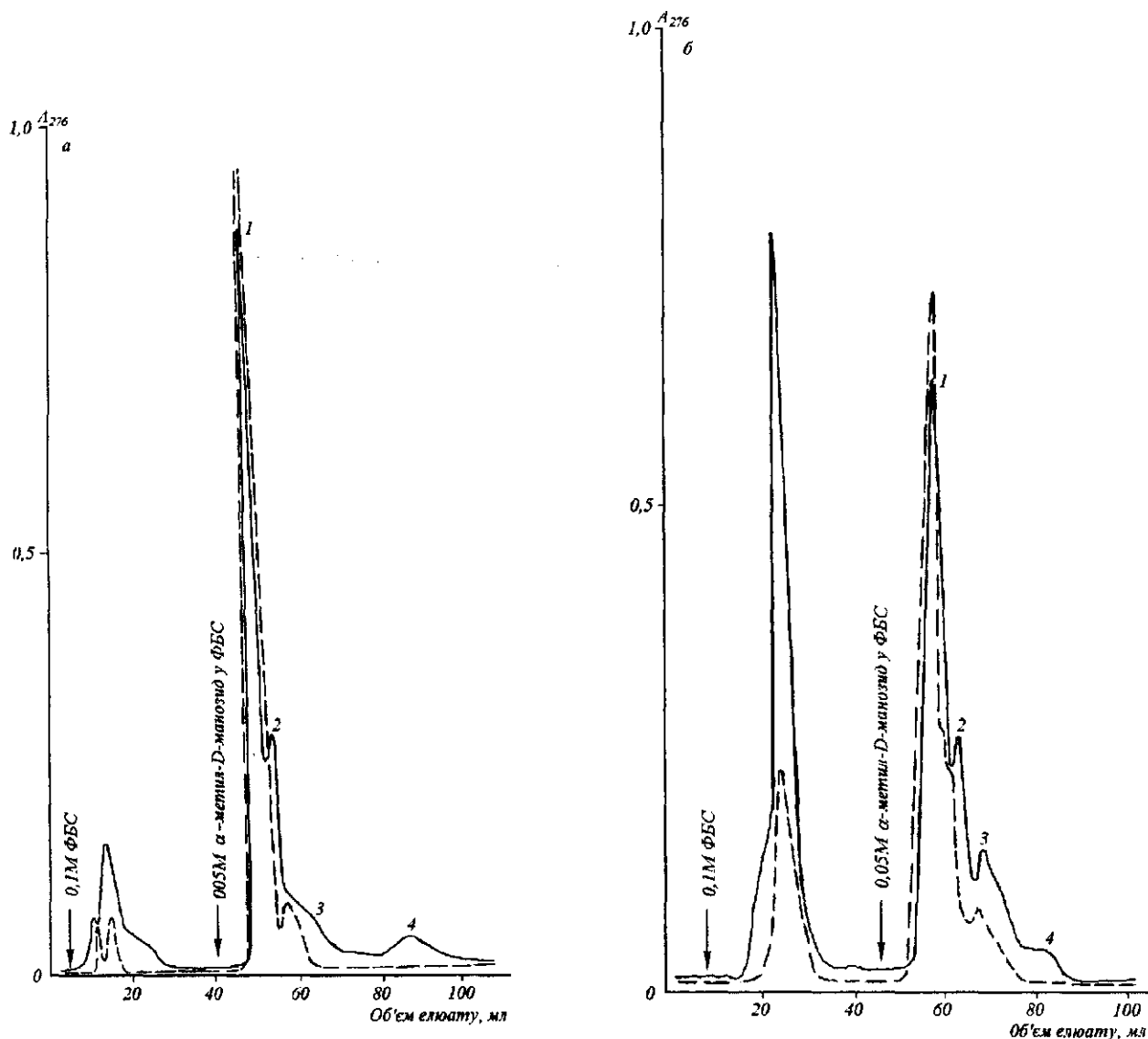


Рис. 3. Афинна хроматографія на конканавалін А-сефарозі очищеного на біогелі Р-10 та ДЕАЕ-сефадексі А-25 (а) та лише на біогелі Р-10 (б) препарату з міжклітинної рідини, вилученої з листя тютюну сорту Імунний 580, здорового (штрихова лінія) та ураженого ВТМ (суцільна лінія, 1-ша доба після інюкаляції). Інші пояснення див. текст

міжклітинній рідині листя надчутливого сорту тютюну Імунний 580 через 1 добу після інюкаляції їх ВТМ [2]. На відміну від попередніх дослідів, у цій роботі нам вдалося розфракціонувати «нові» компоненти, очевидно, тому, що тут досліджували не етанольні преципітати з міжклітинної рідини інфікованих і здорових рослин, а отримані з неї хроматографічні фракції, а також тому, що КонА-сполучні ГБП елюювали α -метил-*D*-манозидом не відразу після відмивання ФБС, як у попередній роботі [2], а після витримування зрівноваженої ним колонки упродовж ночі при температурі 4 °С.

Слід відзначити, що одержані препарати і їхні

фракції містили в своєму складі як білки, так і вуглеводи, причому останніх, як правило, було більше (у 1,5–30 разів). Очевидно, у більшості випадків мова йде не про індивідуальні білки і вуглеводи, а про гетерополімери — глікопротеїни чи глікобіополімери, позаяк останні виявилися хроматографічно (на КонА-сефарозі) гомогенними. Попереднім аналізом «пікових» фракцій (рис. 3), елюйованих α -метил-*D*-манозидом, визначено, що у більшості з них присутні як білки, так і вуглеводи. Лише у фракції 1 (крива 1) досліді білків не знайдено. Той факт, що виявлені компоненти у процесі афинної хроматографії сполучалися з манозидом,

зо-глюкозоспецифічним лектином ConA, може свідчити про наявність у їхньому складі манози та/або глюкози.

Таким чином, на ранніх стадіях ВТМ-інфекції у надчутливих рослин тютюну в міжклітинному просторі з'являються принаймні два ГБП, відсутні в контролі. Крім того, під впливом вірусної інфекції окремі ГБП, очевидно, піддаються додатковому гліколізуванню і в них можуть з'являтися нові або підсилюватися існуючі активності. Роль цих компонентів у рослині наразі невідома. Однак здається цілком вірогідним, що виявлені компоненти функціонально пов'язані з активністю *N* гена, який зумовлює надчутливу реакцію рослин на вірусну інфекцію.

Вже ідентифіковано гени резистентності (*R* гени) рослин у системах за участі вірусів, бактерій, грибів, нематод і комах [7]. Показано, що більшість *R* генів кодує так звані нуклеотидно-сполучні сайти для багатих на лізин білків і останні можуть діяти на основі білково-білкового зв'язування та білково-вуглеводної взаємодії [8, 9]. Ці генні продукти за вірусного патогенезу здатні прямо або опосередковано взаємодіяти з іншими хазяїн- або вірус-кодованими чинниками [10]. До останніх можуть належати виявлені нами вірус-індуковані міжклітинні ГБП. Ці компоненти, вірогідно, беруть участь у передачі сигналу від інфікованих клітин здоровим та в ініціації надчутливої реакції і пов'язаних з нею локалізації інфекції та індукованої вірусостійкості.

Подальше вивчення структурно-функціональних особливостей виявлених компонентів матиме важливе значення для розуміння механізмів природної та індукованої резистентності рослин, надчутливих до вірусних інфекцій.

А. Г. Коваленко, А. Н. Кириченко, Т. А. Телегеева

Выделение межклеточных гликобиополимеров из листьев сверхчувствительных растений табака, пораженных вирусом табачной мозаики

Резюме

В апопласте пораженных вирусом табачной мозаики сверхчувствительных растений табака сорта Им.мунный 580 выявлена аккумуляция межклеточных гликобиополимеров на ранних стадиях инфекции (через 1 день после инокуляции). Методами гель-фильтрации (на биоэле Р-10), ионообменной (на ДЭАЭ-сепадексе А-25) и аффинной (на конканавалин А-сепарозе) хроматографии выделены два компонента, отсутствующих в контроле. Постулируется участие выявленных компонентов в передаче сигнала от инфицированных клеток здоровым для инициации в растении механизмов локализации вирусной ин-

фекции и/или развития приобретенной устойчивости растительных тканей к реинфекции.

Ключевые слова: вирус табачной мозаики, сверхчувствительная реакция, гликобиополимеры, конканавалин А, распределительная и аффинная хроматография.

O. G. Kovalenko, A. M. Kyrychenko, T. A. Telegieva

Extraction of intercellular glycobio-polymers from leaves of hypersensitive tobacco plants infected by tobacco mosaic virus

Summary

Accumulation of intercellular glycobio-polymers has been discovered at early infection stages (one day after inoculation) in apoplast of hypersensitive tobacco plants infected by tobacco mosaic virus. The two components, absent in control, were extracted by gel-filtration (on bio-gel P-10), ion-exchange (on DEAE-Sephadex) and affinity (on concanavalin A) chromatography methods. The participation of discovered components in signal transfer from infected cells to healthy ones is postulated. Due to the signal, the mechanisms are initiated to localize the virus infection and/or to develop the induced resistance of plant tissue to reinfection.

Key words: tobacco mosaic virus, hypersensitive reaction, glycobio-polymers, concanavalin A, distribution and affinity chromatography.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваленко О. Г., Кириченко А. М., Телегеева Т. А. Вплив ВТМ-інфекції на вміст білків і вуглеводів у надчутливих рослинах тютюну та їхню антивірусну і гемаглютинувальну активність // Укр. біохім. журн.—2003.—75, № 2.—С. 103—108.
2. Коваленко О. Г., Кириченко А. М., Телегеева Т. А. Аффінна хроматографія глікобіополімерів чутливих і надчутливих рослин тютюну, уражених вірусом тютюнової мозаїки // Біополімери і клітина.—2005.—21, № 2.—С. 151—156.
3. Pierpoint W. S. The major proteins in extracts of tobacco leaves that are responding hypersensitively to virus infection // Phytochemistry.—1983.—22, N 12.—P. 2691—2697.
4. Wieringa-Brants D. H., Dekker W. C. Induced resistance in hypersensitive tobacco against tobacco mosaic virus by injection of intercellular fluid from tobacco plants with systemic acquired resistance // Phytopathology.—1987.—118, N 2.—P. 165—170.
5. Коваленко А. Г. Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // Микробиол. журн.—1993.—55, № 6.—С. 76—91.
6. Коваленко О. Г., Кириченко А. М. Локалізація ВТМ-інфекції і розвиток індукованої стійкості у *Nicotiana sanderae* Hort., *Datura stramonium* L. та *D. metel* L. // Микробиол. журн.—2004.—66, № 4.—С. 43—47.
7. Dangl J. L., Jones J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection // Nature.—2001.—411.—P. 826—833.
8. Jones D. A., Jones J. D. G. The roles of leucine-rich repeats in plant defences // Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol.—1996.—24.—P. 90—167.
9. Kajava A. V. Structural diversity of leucine-rich repeats proteins // J. Mol. Biol.—1998.—277.—P. 519—527.
10. Goldbach R., Bucher E., Prins M. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview // Virus Res.—2003.—92.—P. 207—212.

УДК 578.23:578.85/865
Надійшла до редакції 10.03.04