

О.Г. КОВАЛЕНКО, В.В. ШЕПЕЛЕВИЧ

Інститут мікробіології і вірусології НАН України,
Київ, 03143, Україна

ЗМІНИ В УЛЬТРАСТРУКТУРІ І БІЛКОВОМУ МЕТАБОЛІЗМІ РОСЛИН ТЮТЮНУ, УРАЖЕНИХ ВІРУСОМ БРОНЗОВОСТІ ТОМАТА



Методом електронної мікроскопії ультратонких зрізів тканин, уражених вірусом бронзовості томата (ВБТ), показано, що ультраструктурні зміни в клітинах залежать від вірулентності вірусу: слабовірулентний ізолят індукує переважно вірусоспецифічні зміни (вірусні частки і вірусні включення), сильновірулентний — поряд з вірусоспецифічними викликає значні неспецифічні порушення структури клітинних органел, що можуть бути наслідком патологічної дії вірусу. Встановлено, що суворі вірусні інфекції призводять до зниження загального вмісту білків у листі. Водночас вона індукує утворення принаймні трьох патогенез-асоційованих білків (PR-білків) та двох білкових антивірусних чинників типу АВФ [6] та ІВР [7], активних щодо вірусу тютюнової мозаїки.

© О.Г. КОВАЛЕНКО, В.В. ШЕПЕЛЕВИЧ, 2003

Вступ. Взаємовідносини вірусів і рослин-хазяїв варіюють в залежності від патогенності вірусу, з одного боку, і сприйнятливості (стійкості) до нього рослини — з іншого. У відповідності з цим вірусні інфекції поділяють на системні, локальні та сублімінальні [1]. Системні інфекції у толерантних рослин можуть мати латентний (безсимптомний) характер, перебіг же інфекції у високосприйнятливих рослин зазвичай супроводжується м'якими симптомами типу жовтухи, мозаїки, рідше — суворою некротизацією уражених тканин [2].

Прикладом вираженої системної інфекції некротичного типу може бути інфекція, викликана вірусом бронзовості томата (ВБТ), tomato spotted wilt virus, у різних видів *Nicotiana sp.* [3]. Характерними ознаками цієї інфекції є посвітління жилок, сіткуватість, некротизація та серповидність листової пластинки — симптоми, які за певних умов (зниження температури та освітлення) можуть завершуватись тотальною некротизацією тканин та відмиранням усієї рослини. Така симптоматика хвороби, очевидно, обумовлена тим, що репродукція та накопичення ВБТ локалізовані переважно у провідних тканинах та клітинах паренхіми, що межують з ними [2].

Метою даної роботи є дослідження ультраструктури та білкового метаболізму клітин тютюну, уражених ізолятами ВБТ різної вірулентності, в динаміці інфекції.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень слугували зразки уражених ВБТ рослин тютюну сорту Імунний 580, надчутливого до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), а також гібрида Американ 307 × Лехія. Вірус із уражених тканин екстрагували за допомогою ГСМ-буфера (0,1 М гліцину, 0,01 М $MgCl_2$ та 0,01 М Na_2SO_4) рН 8,0 при 0 °C та інокулювали, як вказано у попередній роботі [3].

Рослини вирощували в теплиці у весняно-літній період за звичайних умов. Дослідні рослини інфікували ВБТ, екстрагованим ГСМ-буфером, контрольні обробляли в такий же спосіб водою чи відповідним буфером. Для інокуляції використовували суворий (с) та мозаїчний (м) ізоляти ВБТ [4]. Інфіковані та контрольні листки для аналізів відбирали в динаміці інфекції через 3–12 тижнів після інокуляції.

Клітинні екстракти (КЕ) з листя тютюну отримували шляхом гомогенізації листя в ГСМ-буфері, як вказано вище, з наступним центрифугуванням (105000 g, 90 хв). Міжклітинну рідину

(МР) видаляли шляхом інфільтрації ізольованого листа ГСМ-буфером в суміші з 1 М NaCl, наступного центрифугування (10 000 g, 10 хв) і ліофілізації.

Вміст білка в препаратах визначали методом Bredford [5].

Антивірусні речовини типу антивірусного фактора (АВФ) [6] та інгібітора вірусної реплікації (ІВР) [7] отримували із інокульованих ВБТ рослин (дослід) та здорових, інокульованих відповідним буфером (контроль), і випробовували їх активність за допомогою методів, описаних нами раніше [8]. Наявність активності у АВФ та ІВР тестували в системі ВТМ — диски із листа тютюну сорту Самсун, чутливого до даного вірусу. Антивірусні препарати в концентрації 30 та 60 мкг/мл відповідно були інфільтровані в диски через 30 хв після інокуляції їх ВТМ. Через 3 доби диски, що культивувались у вологих камерах при штучному освітленні (6000 лк), гомогенізували у воді (1:10), і концентрацію інфекційного вірусу в них визначали за допомогою інокуляції рослини-індикатора — *Datura stramonium* L.

Результати визначення антивірусної активності препаратів АВФ та ІВР обробляли статистично і на рисунку подавали у вигляді довірчих інтервалів, у таблиці — у вигляді рівнів значущості різниць або відношень, які позначали відповідними символами [9].

Патогенез-асоційовані білки (PR-білки) в екстрактах здорових та інфікованих ВБТм і ВБТс рослин тютюну виявляли методом електрофорезу у поліакриламідному гелі, як указано в роботі [9].

Проби паренхімної тканини із листа тютюну, інфікованого ВБТс або ВБТм, і відповідного здорового листа фіксували і полімеризували в епон 812 за методиками, описаними нами раніше [10]. Ультратонкі зрізи, отримані в ультрамікромомі «Reichert» (Австрія), контрастували цитратом свинцю і досліджували в електронному мікроскопі JEM-7 («JEOL», Японія) при інструментальному збільшенні 8–28 тис. Найбільш характерні електронно-мікроскопічні картини експонували на фотопластинки, з яких виготовляли фотографії.

Результати досліджень та їх обговорення. Вивчення ультратонких зрізів паренхіми листа тютюну сорту Імунний 580, уражених ВБТс та ВБТм, в електронному мікроскопі дало можливість виявити як вірусоспецифічні, так і неспе-

цифічні вірус-індуковані зміни в ультраструктурі клітин (рис. 1 і 2). В обох випадках у клітинах мезофілу листа та провідних тканин виявлено сферичні вірусні частки (ВЧ) розміром 80–85 нм. Враховуючи кількість ВЧ, що зустрічаються у полі зору електронного мікроскопа, можна вважати, що ВБТм накопичується в уражених тканинах інтенсивніше, ніж ВБТс, або ж останній тут скоріше деградує, вірогідно, під впливом значних катаболічних процесів та певних чинників вірусостійкості, які мають місце в інфікованих клітинах та апопласті. ВЧ в інфікованих клітинах зустрічаються переважно у вигляді кластерів різної конфігурації і величини, замкнених у цистерни ендоплазматичного ретикулуму. В клітинах, уражених м'яким ізолятом досліджуваного вірусу, можна виявити електроннощільні конкременти переважно лінійної структури, які не спостерігались у клітинах здорових рослин та рослин, уражених суворим ізолятом цього вірусу. Включення мають вигляд пучків філаментів, що розміщені паралельно і не перехрещуються один з одним.

У клітинах тютюну, вражених ВБТс, відбуваються глибокі зміни структури органел, особливо хлоропластів, зокрема мембран, що складають ламели і грани; в цитоплазмі спостерігається посиленна вакуолізація; тонопласт і плазмалема значно дегенерують, мітохондрії, як правило, гіпертрофовані і набрякають. Водночас клітини, інфіковані ВБТм, за ультраструктурою мало відрізняються від контрольних. Деструктивні процеси у них маловиражені, мембрани і органоїди взагалі мають нормальний вигляд.

Отже, ультраструктурні зміни в рослинних клітинах, уражених ВБТ, залежать від вірулентності вірусу: слабовірулентний ізолят індукує переважно вірусоспецифічні зміни, сильновірулентний — поряд з вірусоспецифічними викликає значні неспецифічні (патологічні) порушення структури клітинних органел, що дуже нагадують ті, які мають місце при локальній інфекції ВТМ у рослин тютюну, надчутливих до цього вірусу [11, 12].

З огляду на ці результати важливо було дослідити зміни у білковому метаболізмі тютюну при ВБТ-інфекції, зокрема синтез PR-білків та антивірусних речовин як можливих чинників вірусостійкості, оскільки вони відомі як такі за локальної вірусної інфекції у надчутливих рослин [7, 8, 13].

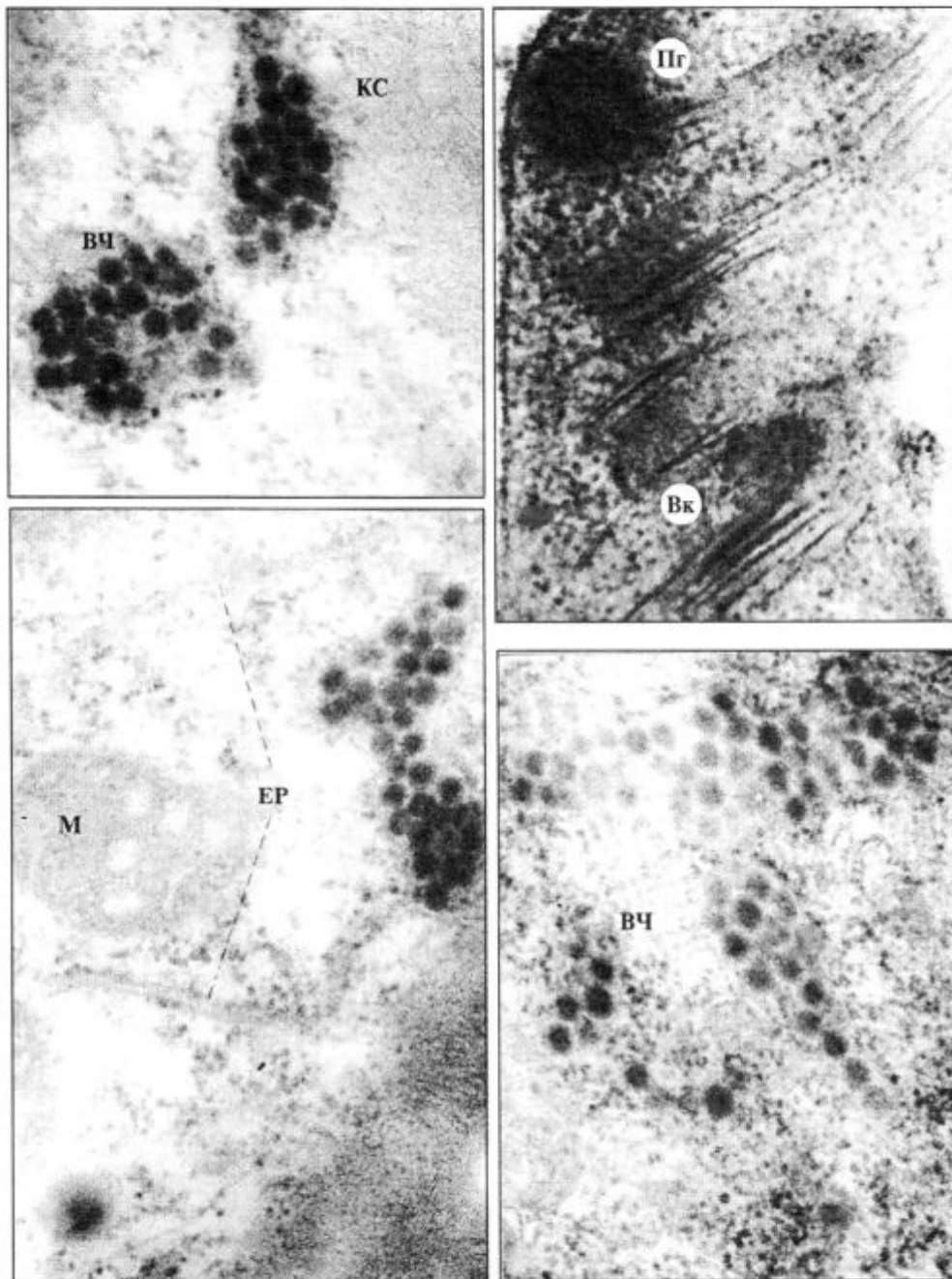


Рис. 1. Вірусні частки та вірусні включення в цитоплазмі клітин тютюну Імунний 580, ураженого ВБТм: Вк — вірусні включення (пучки філаментів); ВЧ — вірусні частки; КС — клітинні стінки; М — мітохондрії; Пг — пластоглобули; ЕР — ендоплазматичний ретикулум; $\times 55000$

Аналіз рослин тютюну, інфікованих ВБТ у польових умовах, на вміст білків показав (таблиця), що вірусна інфекція в цілому призводить до пригнічення синтезу (або прискорення розпаду) цих речовин в листі. Певна «корекція» білкового обміну відбувається у здорових листках хронічно

інфікованих рослин, що набувають ознак само-оздоровлення («видужування»), очевидно, завдяки синтезу нових білкових компонентів, які несуть на собі захисні функції. Подібні спостереження на тютюні було зроблено нами при локальній ВБТм-інфекції [8, 9]. Це слугувало нам підґрун-

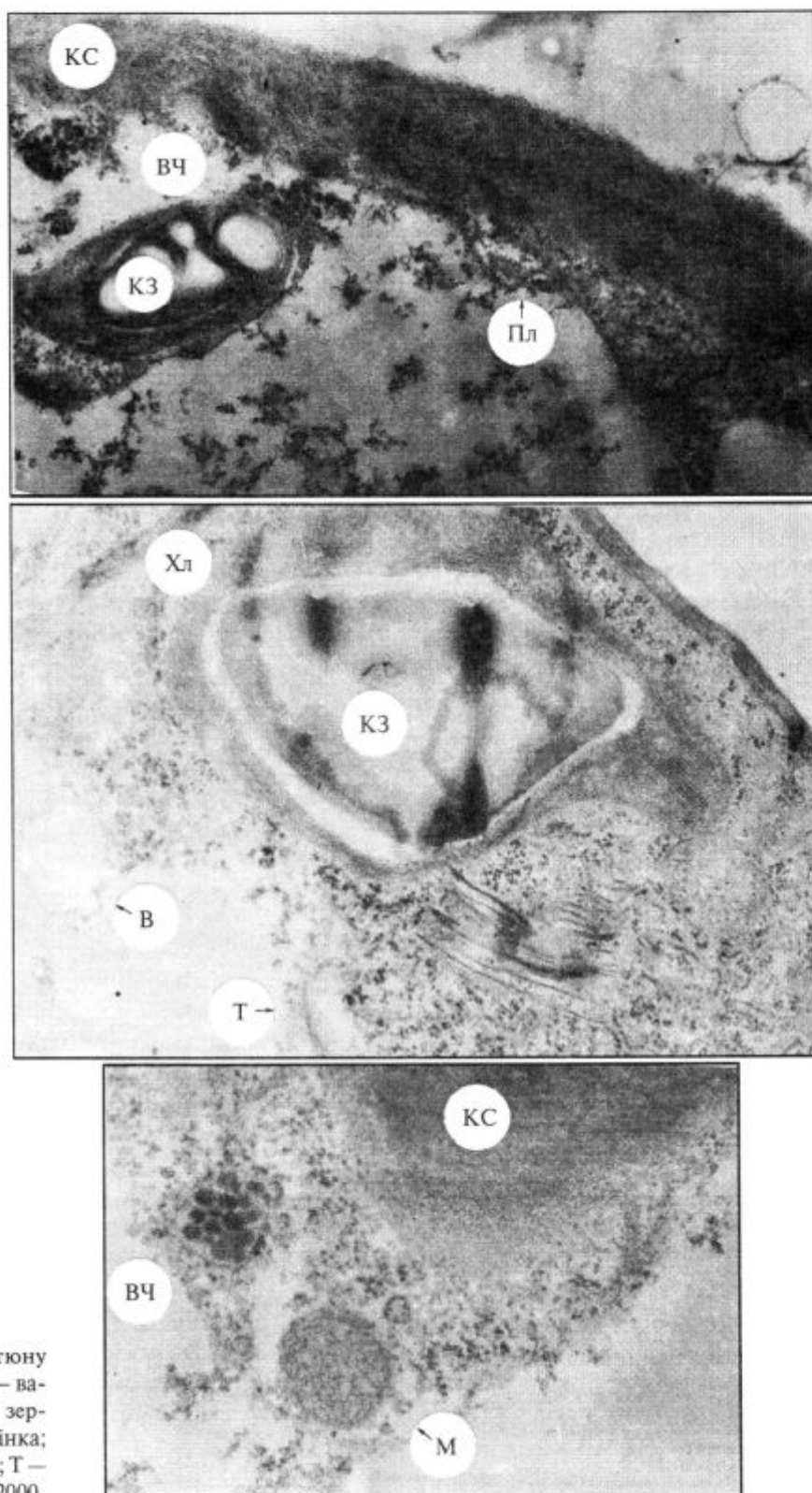


Рис. 2. Фрагменти клітин тютюну Імунний 580, ураженого ВЕТс: В — вакуолі; ВЧ — вірусні частки; КЗ — зерна крохмалю; КС — клітинна стінка; М — мітохондрії; Пл — плазмалема; Т — тонопласт; Хл — хлоропласти; $\times 32000$

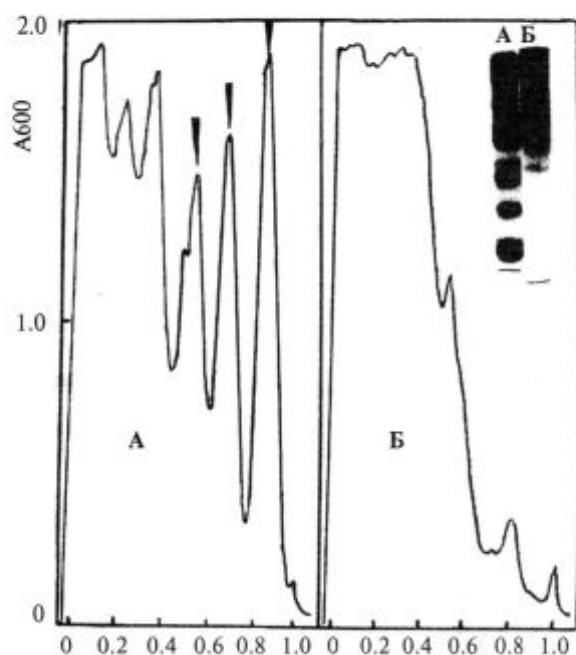


Рис. 3. Електрофорез розчинних (рН 2,8) білків із листя тютюну Імунний 580, уражених ВБТс (А) і здорових рослин цього сорту (Б) в 10% ПААГ

Вміст білків в рослинах Американ 307 × Лехія, уражених ВБТ

Досліджувані матеріали	Вміст білків	
	мг/мл	%
Міжклітинна рідина		
Рослини, уражені ВБТ	0,35 ± 0,01	71,4*
Здорові рослини	0,49 ± 0,02	100,0
Клітинний екстракт		
Рослини, уражені ВБТ	18,87 ± 0,71	53,8*
Здорові рослини	35,05 ± 0,99	100,0

Примітки. Міжклітинну рідину отримували інфільтрацією ГСМ-буфера, що містив 1 М NaCl, в листя з наступним центрифугуванням їх при 10000 g впродовж 10 хв. Клітинний екстракт готували шляхом гомогенізації листя в ГСМ-буфері (1 : 5) з наступним центрифугуванням при 105000 g впродовж 90 хв. *P < 0,01 %.

тям для виявлення антивірусних та патогенез-асоційованих білків у тютюну при ВБТ-інфекції.

Електрофоретичний аналіз нативних екстрактів, отриманих із інфікованих ВБТ рослин тютюну сорту Імунний 580, в лужній системі показав, що ВБТс індукуює принаймні три мажорних білкових компоненти, що мігрують в 10%-ному поліакриламідному гелі з Rf 0,57; 0,71 і 0,89 (рис. 3). Мето-

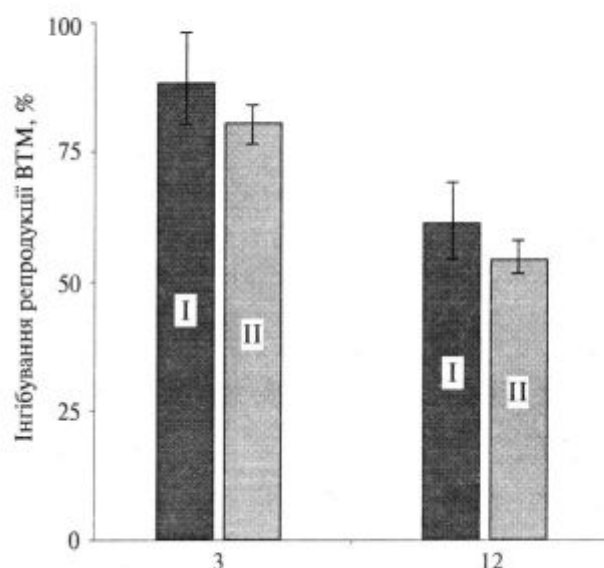


Рис. 4. Виявлення антивірусних чинників типу АВФ (І) та ІВР (ІІ) у рослинах тютюну, уражених ВБТс, за гострої (3 тиж.) та хронічної стадії (12 тиж.) інфекції (по горизонталі). Препарати АВФ (60 мкг/мл) та ІВР (30 мкг/мл) були інфільтровані в диски із листя тютюну сорту Самсун через 30 хв після їх зараження ВТМ. Вміст інфекційного ВТМ в дисках визначали через 3 доби на дурмані

дом електрофорезу з білками, вилученими в такий же спосіб з листя цього сорту тютюну, ураженого ВТМ, встановлено, що виявлені ВБТс-індуковані білки за існуючою класифікацією [14] відповідають PR-білкам тютюну 1-ї групи, а саме: 1a, 1b, 1c. Цікаво, що мозаїчний ізолят цього вірусу (ВБТм) не викликав змін у складі білкових компонентів тютюну, що може бути аргументом на користь того, що саме некротична реакція рослин на ВБТс-інфекцію, але не репродукція вірусу є причиною утворення додаткових білкових компонентів, і що ці компоненти кодуються не вірусним, а клітинним геномом. Водночас ген N, що обумовлює надчутливу реакцію тютюну до ВТМ, у нашому випадку не мав відношення до індукції PR-білків, оскільки характерного для цього гена білка «b1» при ВБТс-інфекції нами не виявлено.

У рослинах тютюну, інфікованих ВБТс, поряд з PR-білками нами було виявлено також два білкових компоненти, що мають антивірусну активність (рис. 4), причому антивірусні чинники типу АВФ [6] та ІВР [7] виявляються як на ранній (через 3 тиж.), так і на пізній (12 тиж.) стадії інфекції. Більше того, на пізній стадії активність обох антивірусних чинників виявилась вищою, ніж на ранній. Це може свідчити на користь важ-

ливої ролі їх у самооздоровленні («видужуванні») рослин — феномена, характерного для суворой некротичної інфекції.

Отже за змінами, що відбуваються у тютюні за системної некротичної ВБТ-інфекції у білковому метаболізмі, так само як і в ультраструктурі клітин, цей тип інфекції нагадує сповільнену надчутливу реакцію разом з багатьма іншими ознаками, характерними для неї [1, 8, 9, 12]. До цих ознак належить зокрема здатність уражених ВБТ рослин до індукції набуті неспецифічної вірусостійкості без локалізації інфекції [4]. Подальше порівняльне вивчення типів вірусостійкості, що супроводжуються цими двома типами вірусної інфекції, може надати важливі відомості для розуміння їх механізмів та контролю.

Автори висловлюють щире подяку канд. біол. наук Л.В. Колесник за допомогу у проведенні електронно-мікроскопічних досліджень, а також канд. с.-г. наук Є.О. Рудю (Кримська дослідна станція тютюництва) за надання зразків тютюну, уражених ВБТ у польових умовах.

SUMMARY. As the result of electron microscope investigation of ultra-thin sections of the tissues infected by tomato spotted wilt virus it was shown that ultrastructural changes in the cells depend on the virus virulence. The isolate with low virulence induces mostly virus-specific changes (virus particles and virus inclusion bodies); the isolate with high virulence besides the virus-specific changes causes essential non-specific violation of cell organelle structure that could be the consequence of pathological action of the virus. It was determined that severe virus infection results in the decrease of general content of the proteins in the leaves. At the same time it induces formation of at least three pathogenesis-associated proteins (PR-proteins) and two antiviral factors of the types AVF (6) and IVR (7) activetowards tobacco mosaic virus.

РЕЗЮМЕ. Методом електронної мікроскопії ультратонких срезів тканин, поражених вирусом бронзовости томата (ВБТ), показано, что ультраструктурные изменения в клетках зависят от вирулентности вируса: слабовирулентный изолят индуцирует преимущественно вирусоспецифические изменения (вирусные частицы и вирусные включения), сильновирулентный вместе с вирусоспецифическими вызывает существенные неспецифические нарушения структуры клеточных органелл, которые могут быть следствием патологического действия вируса. Установлено, что суровая вирусная инфекция приводит к снижению общего содержания белков в листьях. Вместе с тем она индуцирует образование по крайней мере трех патогенез-ассоциированных белков (PR-белков) и двух белковых антивирусных факторов типа АВФ (6) и ИВР (7), активных по отношению к вирусу табачной мозаики.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коваленко А.Г. Природные механизмы ограничения вирусных инфекций у растений и пути их практического использования. — М.: ВИНТИ, 1983. — С. 91—107 (Итоги науки и техники. Сер. Защита растений; т. 3).
2. Mumford R., Barker I., Wood K.R. The biology of tospoviruses // *Criptogemie Micol.* — 1996. — 17, № 1. — P. 169—183.
3. Коваленко А.Г., Рудь Е.А., Стреляева Н.И., Олещенко Л.Т. Реакция сортов, диких видов и межвидовых гибридов табака на искусственное заражение вирусом бронзовости томатов // *Микробиол. журн.* — 1987. — 49, № 1. — С. 86—89.
4. Коваленко О.Г., Рудь С.О., Стреляева Н.И., Шенелевич В.В., Гудков В.О. Патогенез та індукована вірусостійкість у рослин тютюну, уражених вирусом бронзовости томата // *Микробиол. журн.* — 2003 (друку).
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* — 1976. — 72, № 1. — P. 248—254.
6. Antignus G., Sela I., Harpaz I. Further studies on the biology of an antiviral factor (AVF) from virus-infected plants and its association with the N-gene of *Nicotiana* species // *J. Gen. Virol.* — 1977. — 35, № 1. — P. 107—116.
7. Loebeinstein G., Van Praagh T. Extraction of a virus interfering agent induced by localized and systemyc infection // *Host-parasite relations in plant pathology.* — Budapest, 1964. — P. 53—68.
8. Коваленко А.Г., Грабина Т.Д., Коваленко Э.А., Пилипенко В.Г. Индукция устойчивости к вирусу табачной мозаики и изменения в составе растворимых белков у табака // *Микробиол. журн.* — 1987. — 49, № 3. — С. 80—86.
9. Коваленко А.Г., Олевинская З.М., Телегеева Т.А. и др. Антивирусные и патогенезозависимые белки у табака с локальной и системной индуцированной устойчивостью // *Микробиол. журн.* — 1991. — 63, № 4. — С. 58—66.
10. Kovalenko A.G., Grabina T.D., Kolesnik L.V. et al. Virus resistance induced with mannan sulphates in hypersensitive host plants // *J. Phytopath.* — 1993. — 137, № 2. — P. 133—147.
11. Gianinazzi S., Schneider C. Differential reaction to tobacco mosaic virus infection in Samsung 'nn' tobacco plants. 2. A comparative ultrastructural study of the virus-induced necrosis with those of Xanthi-nc // *Phytopath. Z.* — 1979. — 98, № 4. — P. 313—323.
12. Реунов А.В. Цитопатология пораженной вирусами (ВТМ, ХВК) растительной клетки и проблема устойчивости растений : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Киев, 1989. — 36 с.
13. Gianinazzi S. Antiviral agents and inducers of virus resistance: analogies with interferon // *Active Defence Mechanisms in Plants* / Ed. R.K.S.Wood. — New York; London : Plenum Press, 1982. — P. 276—298.
14. Antoni W.J.F., Ritter C.E., Plerpoint W.S., Van Loon N.C. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV // *J. Gen. Virol.* — 1980. — 47. — P. 79—87.

Надійшла 21.01.03