

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS
CENTRAL BOTANICAL GARDENS
Laboratory of Plant Biochemistry and Biotechnology

CELL NUCLEI OF PLANTS — EXPRESSION AND RECONSTRUCTION

After Materials of I Regional Conference,
Minsk, 28th-29th of July, 2001)

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Лаборатория биохимии и биотехнологии растений

Клеточные ядра растений — Экспрессия и реконструкция

Материалы I Региональной научной конференции
г. Минск, 28–29 мая 2001 г.

Минск
2001

УДК 582.31/9:581.17

Научные рецензенты:

В.М.Юрин, доктор биологических наук, профессор (БГУ)
З.Я.Серова, доктор биологических наук (ИЭБ им. В.Ф.Купревича)

Изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер высших растений, путей регуляторного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгенеза. Представлены отдельные проблемы взаимодействия генома и пластома, чужеродных геномов, а также вопросы регуляторного воздействия на органеллы и клетки фитогормонов.

Редакционная коллегия:

В.Н.Решетников, Н.В.Гетко, О.П.Булко,
Т.И.Фоменко, Е.В.Спиридович

Материалы конференции изданы благодаря финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований

ПОЛИМОРФИЗМ ЛЕГКОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ КИСЛОЙ ФРАКЦИИ У РОДСТВЕННЫХ КЛОНОВ *SOLANUM TUBEROSUM*, КОНТРАСТНЫХ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К X- И L- ВИРУСАМ КАРТОФЕЛЯ.

Власова А.Б., Палилова А.Н.

Институт генетики и цитологии НАН Б, Минск 220072, ул.

Академическая 27

e-mail: biolog@it.org.by

Методом SDS-гель электрофореза исследован полиморфизм кислых легкорастворимых белков между родственными клонами *Solanum tuberosum* с геномами сортов Альтаир и Аксамит. Показано отсутствие некоторых фрагментов этой белковой фракции в спектрах стабильно устойчивых к X- и L- вирусам картофеля клонов, которые присутствуют в спектрах клонов восприимчивых и сверхвосприимчивых к этим вирусам. Обсуждаются общие вопросы защитных механизмов растения - хозяина к вирусной инфекции.

Введение. Современные представления о механизмах взаимоотношений хозяин-патоген при развитии инфекционного процесса в растении предполагают возможность действия вирусов в качестве активных возбудителей реакций восприимчивости или супрессоров защитных реакций растения-хозяина. Устойчивость к тому или иному патогену, определяемая взаимодействиями гена-ген, как правило, проявляется через реакцию гиперчувствительного ответа, а гены устойчивости (R гены) ответственны за процесс распознавания патогена [1, 2, 3]. Наиболее широко распространенная устойчивость растений-нехозяев к данному патогену, включает также высококоординированные и локализованные изменения клеточной стенки растения [1] в месте проникновения инфекции. Связи, возникающие между вирулентной и авирулентной функциями генов патогена с генами растений имеют двойственное проявление, зависящее от аллельного состояния R генов, а также совместимости с соответствующими генами патогена [4, 5]. Предполагается также, потенциальное влияние вируса на преобразование защитных путей растения не связанных непосредственно с вирусной инфекцией и контролирующими другие реакции клеток растения-хозяина. Однако все эти вопросы пока изучены недостаточно. Одной из наиболее важных задач в изучении

механизмов взаимоотношений растение – патоген остается расшифровка функций совместимости / несовместимости растения и вируса, управляющих развитием вирусной инфекции в клетках растений. Для решения этой задачи необходимы соответствующие модельные системы, включающие растения, накапливающие высокие концентрации вирусов в клетках, стабильно устойчивые клоны, мутанты, утратившие устойчивость или восприимчивость к данным вирусам. Создание таких форм осуществляется методом инсерционного мутагенеза, однако, они, как правило, мало жизнеспособны, и поэтому недостаточно информативны. В этой связи важной задачей остается поиск спонтанных жизнеспособных мутантов аналогичного типа.

В процессе исследований развития вирусной инфекции в растениях картофеля, различающихся по устойчивости к X- и L-вирусам, в Институте генетики и цитологии НАН Б создана коллекция мутантных клонов картофеля, отвечающих перечисленным выше требованиям. Эти клоны получены методом многоступенчатого отбора на основе данных иммуноферментного анализа содержания этих вирусов в соке растений (Палилова А. Н., Даниленко Н.Г., 1992 г., авт. свид.). Среди них имеются стабильно устойчивые к X- и L- вирусам клоны, сверхвосприимчивые к двум вирусам, утратившие устойчивость к одному из них, сверхвосприимчивые к одному и нестабильные по устойчивости к другому вирусу. Растения перечисленных клонов сохраняют жизнеспособность и являются хорошей модельной системой для исследований механизмов взаимоотношений «растение-патоген».

Целью данной работы являлось обнаружить полиморфизм легкорастворимых белков кислой фракции у родственных клонов картофеля, различающихся по степени устойчивости к X- и L- вирусам картофеля методом SDS-гель электрофореза, что даст возможность выявить факторы патогенности этих вирусов, а также белки растения-хозяина, участвующие в защитных механизмах.

Материалы и методы. Для исследований были использованы клоны картофеля из описанной выше модельной коллекции с генотипами сортов белорусской селекции Аксамит и Альтаир: обладающие стабильной устойчивостью к X- (ХВК) и L- (ВСЛК) вирусам, устойчивые к одному из вирусов и восприимчивые ко второму, а также клоны, нестабильные по устойчивости, или восприимчивые к обоим вирусам растения (табл. 1).

Выделение легкорастворимой фракции кислых белков из листьев картофеля осуществляли методом Сафоновых [9] из зеленого листового материала на холоду, растирая его в присутствии 0,2 М ацетатного буфера (рН 4.7), в соотношении навеска: буфер=1:3. Экстракционную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 30 мин на холоду. Супернатант сливали в чистую пробирку и вторично центрифугировали при тех же условиях. Полученный супернатант, содержащий легкорастворимые белки кислой фракции, отделяли от осадка и хранили при -20°C . Фракции белков листьев картофеля анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в щелочной системе с додецилсульфатом Na (SDS) по методу Laemmli [10] с некоторыми модификациями. Для разделения белковых компонентов использовали гели с концентрацией 12,5%, а также линейным градиентом концентрации мономеров ПААГ (8-24%), в качестве концентрирующего геля использовали 6% ПААГ. Электрофорез проводили в буфере, содержащем 0,025 трис-HCl, 0,192 М глицина, рН 8,3, и 0,1 % SDS. После разделения гели фиксировали 20 % ТХУ и окрашивали 0,1 % Кумасси R-250 в растворе 25 % этанола и 8% уксусной кислоты. Окрашенные гели сканировали на лазерном денситометре LKB-2202 (ЛКБ, Швеция) с помощью интегратора 2220 (ЛКБ, Швеция) и при использовании специализированных компьютерных программ получали электронную версию изображения. Определение молекулярных масс исследуемых пептидов производили с использованием специализированного программного обеспечения на основе известных молекулярных масс белков-маркеров.

Результаты и их обсуждение. Кислая фракция легкорастворимых белков, по данным некоторых авторов, содержит в своем составе ряд компонентов, которые относятся к патогенезу и устойчивости растений [11,12], поэтому она была выбрана нами для исследования. При анализе электрофоретических спектров белков кислой фракции, выделенных из зеленых листовых пластинок опытных растений, выявлен полиморфизм фрагментов между родственными клонами картофеля в зависимости от типа устойчивости к X- и L- вирусам и стабильности проявления этого признака.

Клон 5/3 сорта Альгаир, сверхвосприимчивый к двум вирусам, содержат в спектре большее число белковых фрагментов, в сравнении с устойчивым клоном (рис. 1). Фрагменты с м.м. 16.7 kD, 18.0 kD, 25.5 kD, 38.8 kD отсутствуют у клонов № 102/7 и № 104/7,

Таблица 1.

Исходный сорт	№ клона	Устойчивость к вирусам по годам (данные ИФА)											
		1997		1998		1999		2000					
		X-	L-	X-	L-	X-	L-	X-	L-				
Альгаир	5/3	1,306	0,719	>2	>2	.2	>2	0,155	0,231				
	239/3	1,870	0,019	1,794	0,362	>2	1,310	>2	0,387				
	102/7	0,094	0,100	0,217	0,359	0,135	0,598	0,211	0,306				
	104/7	0,094	0,100	0,174	0,296	0,205	0,647	0,021	0,492				
Аксамит	115/2	0,091	0,066	0,206	0,170	0,571	1,492	0,814	0,202				
	109/4	0,120	0,148	0,321	0,299	0,368	0,988	0,099	0,150				
	14/1	1,411	0,218	>2	1,334	1,391	0,216	-	-				
	28/1	1,192	0,258	1,822	1,168	1,291	0,821	>2	0,857				

“-” — клоны не анализировались.

проявляющих стабильную устойчивость в течение ряда лет размножения (таблица 1).

В спектрах сверхвосприимчивых клонов 5/3 и 239/3 все белковые фрагменты присутствуют. Родственные клоны № 102/7 № 239/3, стабильно устойчивые к одному из вирусов и нестабильные по устойчивости к другому, также проявляют полиморфизм белковых фрагментов кислой легкорастворимой фракции.

Наиболее отчетливо это проявляется у клонов с геномом сорта Аксамит. Клоны 14/1 и 115/2 данного сорта отличаются друг от друга по устойчивости к X- и L- вирусам картофеля (рис. 2). Соответственно, в спектре клона 115/2 устойчивого к X- и восприимчивого к L-вирусу отсутствует фрагмент с м.м. 32.1 kD, который обнаруживается в спектре клона 14/1, устойчивого к L- и восприимчивого к X- вирусу. В средней зоне спектра этого клона отсутствует фрагмент с м.м. 28.8 kD, а в нижней зоне - фрагменты с м.м. 14.9 kD и 25.5 kD. Обнаружены также различия между спектрами клонов, контрастных по устойчивости к двум вирусам. Устойчи-

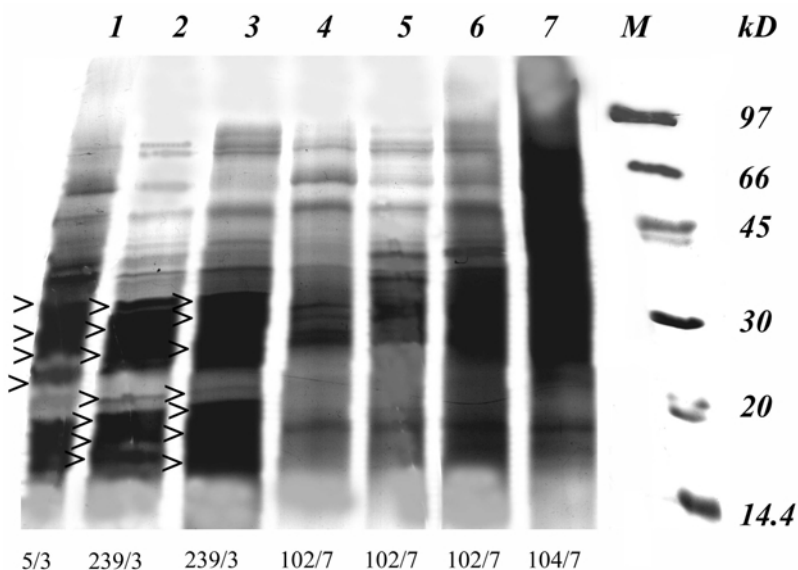


Рис.1. SDS-гель электрофорез (8-24%) кислой фракции легкорастворимых белков клонов сорта Альгаир: 5/3 – восприимчивый к ХВК и ВСЛК; 239/3 – восприимчивые к ХВК, устойчивые к ВСЛК; 102/7 – устойчивые к ХВК, восприимчивые к ВСЛК; 104/7 – устойчивый к обоим вирусам; М – маркерные белки

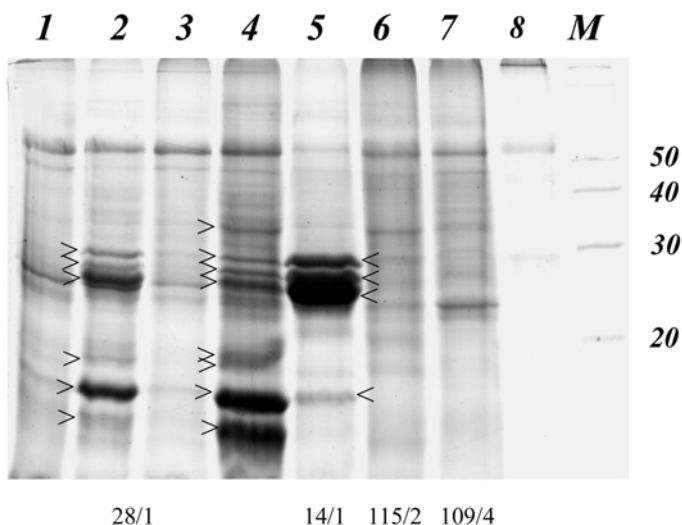


Рис.2 . SDS-гель электрофорез (12%) легкорастворимой фракции кислых белков клонов сорта Аксамит: 28/1 – восприимчивые к ХВК и ВСЛК; 14/1 – восприимчивый к ХВК, устойчивый к ВСЛК; 115/2 – устойчивый к ХВК и восприимчивый к ВСЛК; 109/4 – устойчивый к ХВК и ВСЛК; 8 – вирус X картофеля; М – маркерные белки.

вые клоны 28/1 и 109/4 различаются по фрагментам, расположенным в следующих зонах белковых спектров кислой легкорастворимой фракции: полипептиды с м.м. 38.0 kD, 28.8 kD, 25.5 kD, 17.0 kD и 14.8 kD отсутствуют у устойчивых к двум вирусам клонна 109/4. Все эти фрагменты присутствуют в электрофоретических спектрах восприимчивых к двум вирусам клонов.

Полученные данные, свидетельствуют, на наш взгляд, о том, что устойчивость к X- и L- вирусам у картофеля проявляется как своеобразная нехватка определенных белков, по-видимому, необходимых для репликации вирусных частиц или для передвижения их от клетки к клетке. Другой причиной отсутствия некоторых фрагментов определенных полипептидов у устойчивых к вирусам растений могут быть мутации на уровне ДНК, приводящие к делециям, дупликациям, инсерциям или другим типам преобразования генома у этих растений. Механизмы внутригеномных реорганизаций под действием вирусов у растений пока не изучены. Однако, имеются единичные работы, в которых методом PCR-анализа выявлен полиморфизм между линиями табака, различных по

устойчивости к Y- вирусу картофеля [7, 8] и у сортов картофеля, различных по устойчивости к Y-вирусу. Авторами этих работ показано, что резистентность к Y-вирусу у линий табака и сортов картофеля, проявляется как делеции в геномной ДНК растений. В исследованиях, проведенных в лаборатории генетики фитоиммунитета НАН Б, методом PCR-анализа получены аналогичные данные на клонах картофеля, контрастных по устойчивости к X- и L-вирусам (Палилова А. Н. с соавт., в печати).

Благодарности.

Авторы выражают благодарность академику НАН Б Решетникову В.Н. за предоставление научно-экспериментальной базы лаборатории биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Б для проведения электрофоретических исследований.

Литература

- 1 Carrington J.G., Whitham S. Viral invasion and host defence: strategies and counter-strategies// *Current Opinion in Plant Biology*. 1998. Vol.1. P.236-241.
- 2 Schee D. Resistance physiology and signal transduction//*Current Opinion in Plant Biology*. 1998. Vol. 1. P.305-310.
- 3 Innes R. Genetic dissection of R-gene signal transduction pathways // *Current Opinion in Plant Biology*.1998.Vol.1. P.299-304.
- 4 Ellis V., Dods P. and Prior T. Structure, function and evolution of disease resistance genes// *Current Opinion in Plant Biology*. 2000. Vol. 3. P.279-284.
- 5 Martin G. Functional analysis of plant disease resistance genes and their downstream effectors// *Functional analysis in plant biology*. 1999. Vol. 2.№4. P.275-279.
- 6 Baulcombe D. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing// *Current Opinion in Plant Biology*. 1999. Vol. 2. P.109-113.
- 7 Nogushi M., Tajama T., Jamamoto Y., et al. Deletion of a large genomic segments in tobacco varieties, that are resistant to potato Y-virus (PVY) / *Mol. gen. gen.* 11999.. Vol. 262, P. 822-829.
- 8 Kassai K., Morikaawa Y., Sorri V., et al. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry adg based on a common feature of plant disease resistance genes//.
- 9 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.

- 10 Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. // Nature (Lond). 1970. Vol. 227, P. 680 – 685.
- 11 Pierpoint W.S. // Phytochemistry. 1986 Vol. 25, №7. P. 1595-1601.
- 12 Серова З.Я., Юшко Л.С., Подчуфарова Г.М. Патогенезависимые белки // В кн.: Функции белков в фитопатогенезе // Минск: Навука і тэхніка. -1992, -С.64-99.

Summary

Polymorphism of acid fractions of soluble proteins between related clones of *Solanum tuberosum* with genomes of Altair and Aksamit cv. by a method of SDS-gel electrophoresis is investigated. Absence of some fragments of this protein fraction in spectra of clones stably resistant to PVX and PLRV is shown in comparison with spectra of clones susceptible and supersusceptible to these viruses. The general aspects of defence mechanisms of a host plant are discussed.