

ВИТАМИН Е КАК АКТИВАТОР СИСТЕМНОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ВИРУСНОМУ ПОРАЖЕНИЮ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ

Изучали механизмы защитного действия витамина Е и оценивали его эффективность в индукции защитных реакций у относительно устойчивого к вирусам картофеля *in vitro* (*Solanum tuberosum* L., сорт Невский). Высказано предположение о наличии у растений картофеля альтернативных путей формирования системной устойчивости, специфически активируемой витамином Е.

Ключевые слова: витамин Е, *Solanum tuberosum*, антивирусная устойчивость, иммуностимуляция.

Достаточно давно витамин Е запатентован как регулятор роста и развития растений [1, 2], но возможность этого антиоксидантного соединения индуцировать устойчивость к вирусным патогенам не была изучена. Витамин Е, или альфа-токоферола ацетат, является одним из широко распространенных природных антиоксидантов. Фактически витамин Е включает группу жирорастворимых, химически сходных соединений, производных токоферола, обладающих разной степенью биологической активности. Физиологические функции альфа-токоферола в биомембранах и биоэнергетических процессах определяются, по-видимому, его антиоксидантными свойствами, позволяющими ингибировать процессы перекисного окисления липидов. Известно, что в растениях витамин Е обеспечивает контроль процессов тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования, обмена и функционирования убихинона Q. Установлено, в частности, что витамин Е может влиять на функционирование клеточных ядер и митохондрий и принимать участие в обмене вторичных мессенджеров, участвующих в передаче внешнего сигнала в клетке. Важную роль в механизмах неантиоксидантного действия токоферола и определении специфичности его эффектов играет взаимодействие с токоферолсвязывающими белками. Утверждается, что суммарный эффект от специфического и неспецифического действия витамина Е определяет его витаминную активность. [3]. В связи с этим представлялось важным изучить изменения белковых спектров у растений картофеля при формировании антивирусной устойчивости под действием витамина Е в процессе развития вирусных инфекций.

Материалы и методы

Безвирусные пробирочные растения картофеля (*Solanum tuberosum* L., сорт Невский), обра-

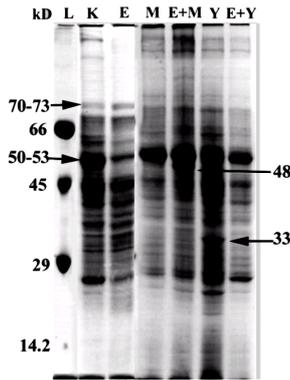
ботанные витамином Е, инокулированные фитовирусами, использовали в качестве модельного объекта для изучения механизмов защитного действия нового иммуностимулятора и оценки его эффективности в индукции устойчивости к вирусным инфекциям. При инфицировании листьев картофеля *in vitro* использовали обыкновенные штаммы следующих фитовирусов: YVK и MBK. Скрининг на антивирусную активность проводили, как описано в работах [4]. Концентрацию белков в образцах определяли согласно модифицированной методике Bradford [5] по реакции связывания с красителем Кумасси G-250, ("Serva", Германия). Фракционирование суммарных белков проводили с использованием пластин 10 – 13%-ного ПААГ в присутствии 10% ДДС-На по модифицированному методу Лэммли [6].

Результаты и обсуждение

В предварительных экспериментах было показано, что максимальной иммуностимулирующей активностью на растениях картофеля была определена концентрация 10^{-8} М.

С целью изучения иммунизирующего эффекта альфа-токоферола ацетата при вирусных инфекциях в модельной системе *in vitro* исследовали белковые спектры растений картофеля, как видно из рисунка. Полученные спектры белков картофеля содержали компоненты в диапазоне от 15 до 100 кД, что совпадает с описанными в литературе результатами исследования белков микроклубней 119 линий картофеля [7].

При изучении спектров белков растений картофеля, инфицированных вирусами YVK нам удалось выявить полипептид с молекулярной массой 33 кД. Из анализа данных литературы известно, что мол. м. капсидных белков составляет для YVK – 30.0 – 33.0 кД, MBK – 31.0 – 36.0 кД. [8]. Таким образом, молекулярные веса капсидных белков, использованных в



Варианты: L – белки-маркеры молекулярной массы; бычий сывороточный альбумин (66 кД), овальбумин (45 кД), карбоангидраза (29 кД), β -лактоальбумин (14,2 кД); K – вода; E – витамин E; M – MVK; E+M – витамин E+MVK; Y – YVK; E+Y – витамин E+YVK.

Рисунок 1. Денатурирующий гель-электрофорез белков картофеля *in vitro* при иммуностимулирующем действии витамина E в процессе вирусных инфекций

работе фитовирусов, соответствовали аналогичным величинам описанных в литературе. Так, мол. м. белка Y соответствует 33 кД, что очень близко к мол. м. одного из капсидных компонентов YVK. Однако, отсутствие второго пептидного компонента в спектре белков растений картофеля после инфицирования YVK дает основание рассматривать выявленный нами белок 33 кД, как индуцируемый полипептид растительного происхождения. Наряду с Y – белком, имеющим мол. м. около 33 кД, выявляются и другие белковые компоненты, интенсивность которых существенно возрастает в определенных вариантах опытов. Так, например в варианте E+M четко идентифицируется белок с мол. м. около 48 кД. Такое разнообразие в изменении интенсивности белковых компонентов не позволяет судить об их функциональной значимости, поскольку здесь не наблюдается какой-либо определенной закономерности. Также обращают на себя внимание 2 группы белков. Первая из них представлена в основном 2 – 3 полосами и расположена в диапазоне белков с мол. м. 50 – 53 кД. Вторая группа белков, которая, вероятно, также, сопряжена с вирусной инфекцией, расположена в зоне белков с мол. м. 70 – 73 кД.

Эта группа белков в основном представлена двумя компонентами. Интенсивность их в контроле значительно ниже, чем при действии витамина E. Интенсивность этих полос возрастает и при инфицировании MVK и YVK.

Таким образом, важную роль в формировании СИУ к вирусным болезням большой интерес представляют белки с мол. м. 50 – 53 и 70 – 73 кД. Общей особенностью этих полипептидов является увеличение их относительного количества при действии вирусной инфекции.

При этом ни в одном из экспериментов нам не удалось детектировать новые белковые компоненты при действии витамина E. Известно, что развитие антивирусной устойчивости при обработке растений некоторыми химическими веществами не всегда сопровождается синтезом PR-белков [9]. Рассмотренные выше результаты позволяют предположить, что исследуемый нами индуктор может активировать защитные реакции картофеля *in vitro*, модулируя экспрессию белков, в частности белков с мол. м. в пределах 50 – 53 и 70 – 73 кД. Таким образом, витамин E, является естественным индуктором системной антивирусной устойчивости и модулятором белкового метаболизма.

На основании анализа полученных результатов и их всестороннего обсуждения сформулированы следующие выводы:

1) формирование системной устойчивости при действии витамина E при инфицировании фитовирусами у толерантного к вирусам картофеля сопровождается ослаблением экспрессии белков с мол. м. в диапазоне 50 – 73 кД;

2) развитие системной антивирусной устойчивости в некоторых экспериментах сопровождается накоплением индуцибельных белков. У картофеля сорта Невский детектируется специфический белок с мол. м. около 33 кД после инфицировании YVK;

3) высказано предположение о наличии у растений картофеля общих и альтернативных путей формирования системной устойчивости, специфически регулируемых витамином E.

Список использованной литературы:

1. Bruinsma J. Pat.N. 3279910 Netherlands. Method of inducing generative organs in plants. Bennekom. 1966. 1 p.
2. Hoffmann E., Hoffmann K. Pat. N. 2156676 BRD. Mittel zur Wachstumforderung von Pflanzen und Tieren. Изобретения за рубежом. 1975. В. 1. С. 43.
3. Капралов А.А., Донченко Г.В., Петрова Г.В. Роль витамина E в процессах функционирования клетки. Антиоксидантные и неантиоксидантные механизмы // Успехи современной биологии 2003. Т. 123, N 6. С. 573–589.

Фундаментальные проблемы изучения и сохранения биологического разнообразия

4. Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Янина М.М., Гилязетдинов Ш.Я. Эмистим – индуктор устойчивости к вирусным болезням пасленовых // *Аграрная Россия*. 1999. N. 1. С. 35–38.
5. Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgramm Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein dye Binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
6. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
7. Rajapakse D.P., Imal T. and Ishige T. Analysis of potato microtuber proteins by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis // *Potato Research*. 1991. V. 34. P. 285–293.
8. Гнутова Р.В. Иммунохимические исследования капсидных белков вирусов растений // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Владивосток: Биол. почвенный институт ДО РАН. 1993. 391 с.
9. Cutt J.R. and Klessig D.F. Pathogenesis-related proteins. In *Plant Gene Research, Genes involved in Plant Defense* / Eds Meins Jr., F. and Boller T. Wien and New York: Springer-Verlag, 1992. P. 209–243.