

WPŁYW INFЕКCJI WIRUSOWEJ NA NIEKTÓRE OKSYDOREDUKTAZY GROCHU

Irena Frencel, Marian Szczepański

Instytut Genetyki Roślin, Pracownia Genetyki Odporności Roślin, PAN w Poznaniu

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się możliwościom stosowania i wykorzystywania biochemicznych metod i technik w badaniach zjawisk fitopatologicznych, szczególnie takich, jak mechanizmy infekcji, patogenezę chorób roślin, ekspresja objawów chorobowych oraz mechanizmy związane z odpornością roślin na patogeny. Celem tych badań, poza naukowo-teoretycznym, są także aspekty czysto praktyczne, ukierunkowane na uzyskanie sensownych wyjaśnień mechanizmów obronnych roślin i na tej podstawie stworzenie podstaw do przyszłych badań nad opracowaniem logicznego systemu naturalnej ochrony roślin przed chorobami oraz ulepszenia metod hodowli odpornościowej.

Patogen, który wniknął do komórek organizmu roślinnego i znalazł tam warunki do rozwoju, najczęściej powoduje zauważalne zmiany fenotypowe rośliny - gospodarza, które nazywamy objawami chorobowymi. W nielicznych tylko przypadkach infekcja przebiega bezobjawowo (latentnie). U podstaw obserwowanych zmian fenotypowych leżą zmiany biochemiczne, indukowane w komórkach zakażonego organizmu wskutek ingerencji patogena w procesy fizjologiczne gospodarza. Można sądzić, że śledzenie zmian metabolicznych w czasie infekcji staje się jedną z metod wyjaśniania mechanizmów regulacji biologicznej i ich znaczenia dla organizmu zdrowego i chorego.

Zjawiska życiowe są wynikiem łańcuchów reakcji chemicznych, których każde ogniwo jest kontrolowane przez odpowiedni enzym. Prawdopodobnie wszystkie mechanizmy regulacji biologicznej, co najmniej do pewnego stopnia, są zależne od regulacji syntezy i aktywności enzymów.

Koncepcja regulacji biologicznej w ogóle, wgląd w molekularne mechanizmy regulacji enzymatycznej, funkcja i ekspresja genów w interak-

cji pomiędzy rośliną a patogenem — oto zagadnienia i podstawowe problemy, które w obecnej dobie stały się przedmiotem zainteresowania fitopatologów, fizjologów i biochemików.

Molekularne aspekty w interakcji roślina - patogen (wirus) są jeszcze mało znane [3, 5, 7]. Przyczyna tego może leżeć w większych trudnościach metodycznych, niż w przypadku mikroorganizmów, związanych z odrębnością swoistego cyklu replikacji wirusów w żywej komórce roślinnej. Inicjacja procesu infekcji wirusowej w roślinie polega na wprowadzeniu do komórek gospodarza, posiadających własną informację genetyczną, wirusowego kwasu nukleinowego, będącego nośnikiem dodatkowej, wirusowej, informacji genetycznej. Patogeneza chorób wirusowych jest więc w gruncie rzeczy zjawiskiem genetycznym.

W przeciwieństwie do innych mikroorganizmów, wirusy nie posiadają niezależnego metabolizmu. Jeżeli obserwuje się towarzyszące infekcji wirusowej w roślinie zmiany biochemiczne, nawet w sensie wytwarzania toksyn komórkowych, to są one wyłącznie indukowanymi produktami komórek lub tkanek zakażonego organizmu gospodarza.

Celem naszej pracy było uchwycenie zmian enzymatycznych (na przykładzie niektórych, dostępnych nam do badań enzymów) w zainfekowanym grochu, oraz porównanie tych zmian, towarzyszących różnym typom objawów chorobowych. Jest to etap gromadzenia informacji dla późniejszej interpretacji mechanizmów odporności roślin oraz ich ewentualnego wykorzystania dla tworzenia nowych genotypów, odpornych na choroby wirusowe.

MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono na grochu (*Pisum sativum* L.) odmiany Kujawski wczesny. Rośliny zakażano wirusem żółtej mozaiki fasoli (BYMV, bean yellow mosaic virus) — izolat B₂₅ szczepu typowego Bos [1] oraz wirusem mozaiki lucerny (AMV, alfalfa mosaic virus). Oba wirusy namnażano na grochu i przechowywano nad CaCl₂ w temperaturze — 20°C (sucha kolekcja).

Reakcja grochu na zakażenie BYMV widoczna jest na ogół po 8-10 dniach od inokulacji w postaci układowej mozaiki liści, podczas gdy infekcja AMV przejawia się wcześniej, po około 3-4 dniach, głównie w postaci plam nekrotycznych występujących zarówno lokalnie, na liściach inokulowanych, jak i układowo.

Rośliny do doświadczeń hodowano w szklarni. Po około 10 dniach od wysiania nasion, w stadium 4-6 liści, dwie partie roślin inokulowano mechanicznie poszczególnymi wirusami (inokulum przygotowywano z suchej kolekcji — każde 100 mg rozcierano z 9 ml wody destylowanej)

a trzecią, stanowiącą kontrolę, wodą. Zainokulowane rośliny umieszczano natychmiast w komorze klimatycznej, o następujących po sobie dwóch programach

I — program dzienny: godz. 7-21, temp. 22°C, wilgotność względna 60%, światło,

II — program nocny: godz. 21-7, temp. 17°C, wilgotność względna 95%, bez światła.

W odpowiednim czasie (tab. 1) ścinano po około 10 g świeżego materiału roślinnego, rozcierano w zimnych moździerzach, wyciskano przez podwójną gazę i tak otrzymany sok wirowano 1 godz. \times 20 000 g. Supernatant używano do dalszych badań.

POMIAR AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Aktywność dehydrogenaz: mleczanowej (LDH, lactate dehydrogenase), jabłczanowej (MDH, malate dehydrogenase) i glutaminianowej (GLDH, glutamate dehydrogenase) oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc spadek gęstości optycznej (OD_{340}) mieszaniny inkubacyjnej pod wpływem enzymu, będący miarą zmniejszenia się stężenia zredukowanego dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego ($NADH_2$). Skład mieszanin inkubacyjnych był następujący: 0,1 M bufor fosforanowy Na/K, 0,0002 M $NADH_2$, sok roślinny. Mieszanina inkubacyjna do pomiaru LDH zawierała ponadto 0,004 M pirogronian Na, do pomiaru MDH — 0,005 M kwas szczawiooctowy, a do pomiaru GLDH 0,16 M octan amonu oraz 0,01 M kwas α -ketoglutarynowy. Reakcje enzymatyczne przeprowadzano w kuwetach kwarcowych, badając sok z roślin inokulowanych poszczególnymi wirusami równocześnie z sokiem z roślin zdrowych, kontrolnych. Aktywność enzymatyczną wyrażano zmianą gęstości optycznej mieszaniny inkubacyjnej przy długości fali 340 nm, wywołaną w czasie 1 min przez 1 mg białka.

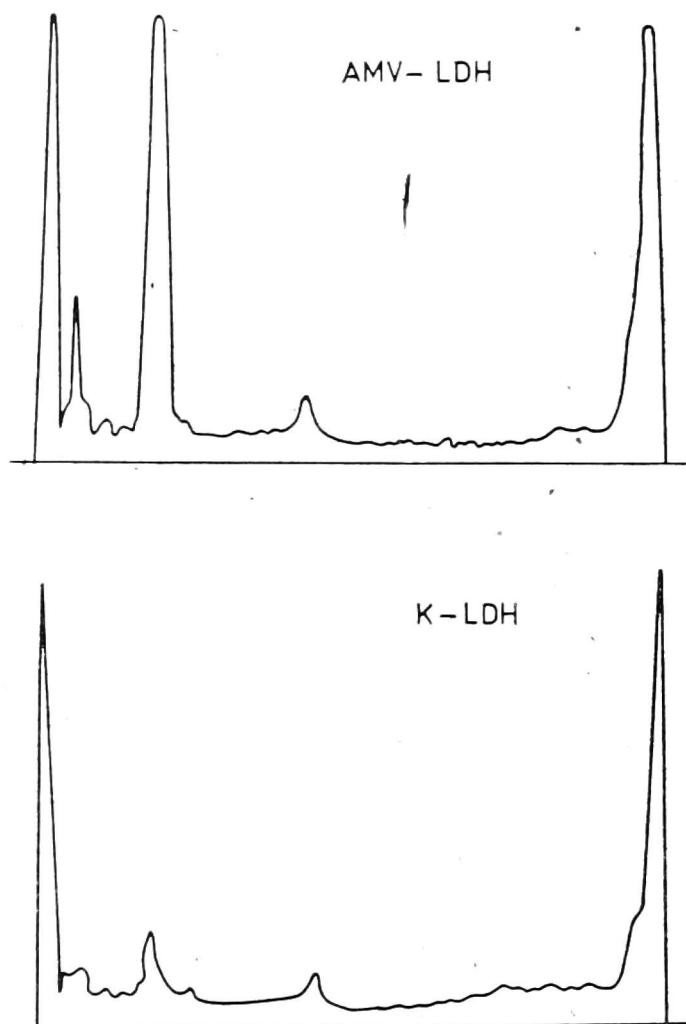
ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY BIAŁEK — IZOENZYMY

Rozdział białek przeprowadzano na żelu poliakrylamidowym 7,5%, w rurkach (5 \times 70 mm), w buforze tris — glicynowym pH 8,9, przy natężeniu prądu 2,5 mA na rurkę, względnie na płytkach żelu (2 \times 90 \times 230 mm) przy natężeniu prądu 100 mA na płytkę. Do rozdziału nakładano jednakowe objętości soku. Położenie izoenzymów LDH po rozdziale elektroforetycznym identyfikowano umieszczając żełe w mieszaninie wywołującej, zawierającej bufor fosforanowy Na/K pH 8, 0,035% błękit nitrotetrazoliowy, 0,02% NAD, 0,6 M mleczan K (pH 8) i 0,003% PMS (N-methylphenazonium methosulphate).

Izoenzymy peroksydaz uwidoczniano zalewając żele nasyconym roztworem benzydyny w 0,2 M buforze octanowym pH 5,0. Po około 20 min inkubacji w temperaturze pokojowej żele umieszczano w roztworze 0,1% wody utlenionej. Wszystkie żele odbarwiano i przechowywano w 7% kwasie octowym. Pomiaru stężenia białka oznaczano metodą Lowry'ego.

WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono wyniki (średnie z pięciu analogicznych doświadczeń) pomiaru aktywności LDH, MDH i GLDH w soku z grochu. Pozwalają one stwierdzić istotny wpływ wirusów AMV i BYMV na aktywność enzymatyczną LDH i GLDH w procesie infekcji grochu. Oba wirusy wyraźnie stymulują aktywność tych enzymów, z tym jednak, że efekt działania AMV na LDH jest przyspieszony w porównaniu z BYMV, a stymulacja GLDH jest nieco silniejsza. Aktywność enzymatyczna MDH w interakcji roślina - wirus w naszych doświadczeniach nie uległa zmianie.

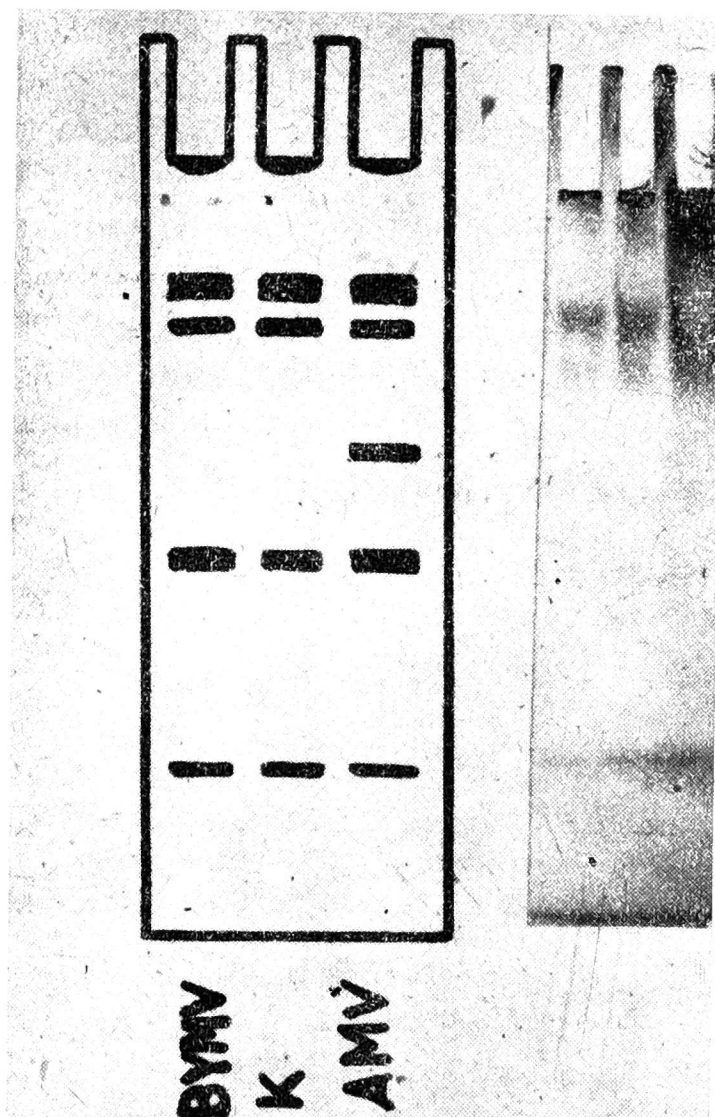


Rys. 1. Densytogramy izoenzymów LDH grochu inokulowanego AMV oraz nieinokulowanego (K — Kontrolnego)

Tabela 1

Aktywność dehydrogenaz w soku z grochu infekowanego wirusami
AMV i BYMV

Enzym	Czas od inokulacji (doby)	AMV			BYMV		
		K	I	%K	K	I	%K
LDH	3	0,034	0,037	107	0,025	0,025	100
	6	0,020	0,039	198	0,024	0,024	100
	8	0,027	0,046	170	0,029	0,070	241
MDH	3	3,083	2,900	94	3,083	2,820	92
	6	1,930	1,760	91	1,930	1,960	102
GLGH	3	0,035	0,049	142	0,036	0,046	126
	6	0,032	0,061	193	0,023	0,039	170
	8	0,027	0,046	170	0,040	0,063	158



Rys. 2. Izoenzymy peroksydazy, 6 — dób po inokulacji wirusami AMV i BYMV; K — rośliny kontrolne. Obok schematu fotografia żelu

Wyniki badań izoenzymów LDH przedstawają densytogramy (rys. 1). Obrazy izoenzymów w zakażonym grochu, zarówno w przypadku infekcji AMV, jak i BYMV, są identyczne. Jak widać, za wzrost aktywności enzymatycznej LDH po infekcji (tab. 1) wydaje się być odpowiedzialnym jeden izoenzym. Izoenzymy peroksydazy przedstawiono na rysunku 2. BYMV nie wpływa na aktywność izoenzymów peroksydazy grochu. Natomiast AMV inaktywuje nowy izoenzym, bądź też stymuluje jego niską, w prawidłowej fizjologii rośliny, aktywność.

DYSKUSJA

Zmiany biochemiczne, towarzyszące infekcji wirusowej w roślinie mogą być tylko odbiciem fizjologicznego stanu rośliny [5, 7, 11], lub też mogą być związane z pełnieniem określonej funkcji w procesie namnażania się cząstek wirusowych w tkankach roślinnych [4, 6, 9, 10]. Badania nasze sugerują, że efekt stymulacji takich enzymów z grupy oksydoreduktaz, jak LDH i GLDH nie jest związany z ekspresją objawów chorobowych typu zmian nekrotycznych w tkankach roślinnych. Korelacja taka natomiast nasuwa się w przypadku wpływu badanych wirusów na peroksydazy grochu, co jest zgodne z aktualnymi poglądami [7, 11].

Wpływ infekcji wirusowej na badane enzymy uwidacznia się stosunkowo późno — po 3, 6 a nawet 8 dobach od infekcji. Sugeruje to wtórną rolę badanych enzymów w interakcji roślina - wirus, lub też bardziej odległe mechanizmy kontroli na poziomie białek enzymatycznych. Oddziaływanie AMV na badane enzymy przejawia się na ogół silniej niż BYMV.

LITERATURA

1. Bos L., Kowalska Cz., Maat D. Z.: *Phytopathology*. 48, 86, 1974.
2. Bozarth R. F., Hecht E. I., Ross A. F.: *Phytopathology*, 52, 4, (abstr.) 1962.
3. Diener T. O.: *Ann. Rev. Phytopath.*, 1, 197, 1963.
4. Frittig B., Goose J., Legrand M., Hirth L.: *Int. Congress Plant. Path. Minneapolis 1973*.
5. Hirai I.: *Int. Congress Plant Path. Minneapolis (abstr. 0435), 1973*.
6. Khurana S. M. P., Zyum Hidaka: *Phytopath. Z.*, 80, 140, 1977.
7. Loon L. C. van: *Physiol. Plant. Path.*, 8, 231, 1976.
8. Munday K. W.: *Ann. Rev. Phytopath.* 1. 173, 1963.
9. Procházková Z.: *Biol. Plant.* 17, 120, Praha 1975.
10. Rohloff H., Lerch B.: *Phytopath. Z.*, 89, 306, 1977.
11. Stein A., Loebenstein G.: *Phytopathology*, 60, 1192, 1976.
12. Uritani I.: *Ann. Rev. Phytopath.* 9, 211, 1971.

Ирена Френцель, Марьян Щепаньски

ВЛИЯНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА НЕКОТОРЫЕ
ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.)

Резюме

Горох сорта Куявски ранний заражали двумя вирусами: AMV, вызывающими некротизацию тканей, и BYMV, вызывающим системную мозаику. В соке зараженных растений установлен рост энзиматической активности лактатной дегидрогеназы (LDH) и глютаминной дегидрогеназы, а отсутствие влияния на активность малеатной дегидрогеназы. Рост активности LDH был связан со стимуляцией только одного изоэнзима этой дегидрогеназы. AMV, противоположно BYMV, оказывает влияние также на изоэнзимы пероксидазы. Сравнивали влияние обоих вирусов на исследуемые энзимы.

Irena Frenzel, Marian Szczepański

VIRUS INFECTION INFLUENCE ON SOME OXYDOREDUCTASES OF PEA

Summary

Pea of Kujawski Wczesny Variety was inoculated with two viruses: AMV, causing agent of tissue necrosis, and BYMV, causing agent of systemic mosaic. In sap. of the infected plants higher activity of lactate (LDH) and glutamine dehydrogenases was found. Malate dehydrogenase activity was not influenced. The increased LDH activity followed stimulation of one isoenzyme only. On the contrary to BYMV, AMV influenced also isoenzymes of peroxidase. The influence of the two viruses on enzymes in question is being compared.