

**УДК 578.24 : 632.38**

**Влияние вирусной инфекции на белковый состав тилакоидной мембраны томата, перца и огурца**

Султанова Наргиз, Гусейнова Асмар, Алиева Дурна, Гусейнова Ирада.

**Аннотация:**

Вирус мозаики огурца (*Cucumber mosaic virus*, CMV) и вирус мозаики томата (*Tomato mosaic virus*, TMV) вызывают вирусные заболевания многих важных растений по всему миру. Из хлоропластов инфицированных растений (огурца, перца и томата) были выделены тилакоидные мембраны и методом электрофореза на градиентном ПААГ (10-25%) проанализирован их белковый состав. Градиентный электрофорез белков тилакоидной мембраны растений перца и томата, инфицированных TMV вирусами, и огурца, инфицированных CMV вирусом, показал, что содержание полипептидов в области 47, 33, 29-24 и 17-15 кДа, входящих в состав субмолекулярного комплекса ФС II и кислородвыделяющего комплекса значительно уменьшается по сравнению с незараженными растениями, что может быть связано со структурными нарушениями в комплексе ФС II.

**Ключевые слова:** вирусы растений, овощные культуры, *вирус мозаики огурца* (CMV), *вирус мозаики томата* (TMV), белки тилакоидной мембраны, градиентный электрофорез.

**Effects of viral infection on the protein composition of the thylakoid membrane of tomato, pepper and cucumber**

Sultanova Nargiz, Huseynova Asmar, Aliyeva Durna, Huseynova Irada.

**Abstract:**

*Cucumber mosaic virus* (CMV) and *Tomato mosaic virus* (TMV) causing viral diseases in many important plants worldwide. Thylakoid membranes were isolated from chloroplasts of infected plants (cucumber, pepper and tomato) and analyzed the protein composition by electrophoresis on PAGE gradient gel (10-25%). The gradient electrophoresis of thylakoid membrane proteins of virus-infected plants was analyzed pepper and tomato plants infected with TMV virus and cucumber plant infected with CMV virus revealed that the content of polypeptide in the 47, 33, 29-24 and 17-15 kDa

comprising the submolecular complex of photosystem II complex and oxygen evolving complex significantly reduced compared with uninfected plants that may be associated with structural abnormalities in the complex PS II.

**Keywords:** Plant viruses, vegetables, *Tomato mosaic virus (TMV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, proteins, thylakoid membrane, gradient electrophoresis.

## Введение

Одной из важных проблем современной биологии является изучение адаптивных механизмов, индуцированных устойчивостью растений к воздействию патогенов. Известно что, действие патогена на растительный организм вызывает значительные изменения в метаболизме и в работе его фотосинтетического аппарата. При этом пораженные растения резко отстают в росте, часто не выколашиваются, листья их подвергаются хлорозу вследствие деградации хлоропластов и включенных в них пигментов, снижается скорость накопления углерода и чистая продуктивность фотосинтеза. Для того, чтобы избежать стресса или уменьшить его влияние, растение может изменить экспрессию своих генов и накопление белков. В настоящее время интенсивно изучается индукция защитных систем и экспрессия генов, кодирующих образование соответствующих белков [6]. Методами двумерного гель-электрофореза и масс спектрометрии большинство белков, индуцированных патогенозом, были полностью идентифицированы и определены их локализации и функции. К ним относятся ферменты таких центральных метаболических путей, как фотосинтез, синтез и деградация белков, производство энергии, биосинтез аминокислот, а также шапероны, антиоксиданты и др. Известно, что хлоропласты, будучи важнейшими энергопреобразующими органеллами растительной клетки, обладают собственной генетической и белоксинтезирующей системой и осуществляют синтез целого ряда ключевых ферментов и структурных белков фотосинтетического аппарата. Белки тилакоидной мембраны составляют около 50% всех белков хлоропластов. Существует мнение, что способность растительной клетки выживать и расти под действием биотических и абиотических стрессовых факторов определяется экспрессией специфических генов и, возможно, генов, кодирующих мембранные белки [4]. Первой стадией понимания изменения генной экспрессии может являться установление корреляции между уровнем генного продукта – белка и степенью устойчивости к вирусам. Нехарактерные реакции клеток на различные стрессовые факторы, главным образом определяются нарушениями их

мембранных аппаратов. Следует отметить, что сохранение нормальной структуры мембран очень важно для проявления устойчивости растений к стрессовым воздействиям внешней среды. Изменение целостности мембран наблюдается при различных воздействиях [1]. Оно отмечено при нарушении водного обмена клеток, при действии разных абиотических и биотических стрессовых факторов, при которых повышается уровень процессов гидролиза и нарушение синтеза белка. Хотя, следует отметить, что наряду с нарушением синтеза белка, если взять в целом, возможно также усиление синтеза различных стрессовых белков, которые играют роль в регуляции конформационных изменений мембран. Как известно, хлоропласты являются стресс-чувствительными участками клетки, но несмотря на это, имеется мало информации относительно их структурных изменений при воздействии вирусных инфекций. В этом аспекте представляется весьма важным изучение действия патогенеза на фотосинтетический аппарат.

Исходя из вышеизложенного, основной целью исследований являлся анализ белкового состава тилакоидной мембраны различных овощных культур, зараженных вирусами.

## **Материалы и методы**

### *Иммуноферментный анализ (ИФА) для диагностики вирусов растений*

Для проведения иммуноферментного анализа с целью диагностики вирусов растений использовали специальные наборы реактивов для ИФА (DAS-ELISA, TAS-ELISA) изготовленные фирмами LCA-biotest (Франция) и DSMZ (Германия). Каждый набор реактивов включал антитела тестируемых вирусов. Для проведения ИФА также использовали 96-луночный полистероловый планшет; лиофильно высушенные положительные и негативные контроли; концентрированные буферные растворы для промывания планшета и для экстракции вируса; конъюгат поликлональных антител – IgG; конъюгат моноклональных антител - МА; конъюгат антител иммунизированных мышей к вирусу со щелочной фосфатазой; субстратный буферный раствор; субстрат – пара-нитрофенилфосфат; стоп-реагент, готовый для использования; крышка для закрытия планшета или пленка для его заклеивания во время инкубации; инструкцию по применению набора. Растительный материал предварительно взвешивали, добавляли буфер для экстракции, содержащий PBST/PVP, из расчета 5-7 мл буфера на 1г исследуемого материала и измельчали в специальных пакетиках, предназначенных для ИФА. Оптическое поглощение продуктов ферментативной реакции измеряли на

спектрофотометре StatFax при длине волны 405 нм (StatFax 303+ (AwarenessTechnology, США)).

### *Количественное определение фотосинтетических пигментов*

Количество хлорофилла и соотношение Хла/Хлб определяли спектрофотометрическим путем (ULTROSPEC 3300 PRO (“AMERSHAM”, США) в 80% и 100%-ном ацетоне.

### *Выделение хлоропластов и тилакоидных мембран*

Одновременно, из хлоропластов растений были выделены тилакоидные мембраны и проанализирован белковый состав методом электрофореза на градиентном ПААГ (10-25%). Листья были измельчены в гомогенизаторе типа Waring Laboratory blender («CHRISTISON», Британия) на полной скорости 4 раза в течение 20 секунд в охлажденной среде для выделения хлоропластов, которая содержала 0,4 М сахарозу, 20 мМ Трис, 10 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА-Na, 1 мМ аскорбат натрия и 0,1% ПЭГ, pH 7,8 [1]. На каждый грамм листьев добавляли 10 мл буфера для выделения хлоропластов. Гомогенат был дважды отфильтрован через четыре слоя марли. Фильтрат центрифугировали 5 мин при 200 g и затем в течение 10 мин при 1000 g в течение 15 мин в центрифуге K-70 (Германия). Полученный осадок хлоропластов гомогенизировали в небольшом объеме среды суспендирования, содержащей 10 мМ MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 7,2. Для эффективного отделения тилакоидных мембран от водорастворимых белков стромы, хлоропласты подвергали осмотическому шоку путем инкубирования в течение 30-60 мин в 200-кратном объеме гипотонического раствора (1 мМ MgCl<sub>2</sub> в 5 мМ трис-HCl буфере, pH 8,0). Полученную суспензию центрифугировали (7 мин при 1000 g), осадок (нелизированные хлоропласты) отбрасывали. Супернатант повторно центрифугировали в течение 20 мин при 5000 g в центрифуге K-24 (Германия, радиус ротора r=8 см). Полученный осадок мембраны суспендировали в 5 мМ трис-HCl буфера, pH 8,0. Материал тилакоидов использовали сразу или замораживали в жидком азоте (77К) для хранения.

### *Проведение градиентного электрофореза в ПААГ для анализа белков тилакоидной мембраны*

Анализ полипептидного состава тилакоидной мембраны образцов здоровых и  
Султанова Н., Гусейнова А., Алиева Д., Гусейнова И., Влияние вирусной инфекции на белковый состав тилакоидной мембраны томата, перца и огурца // «Живые и биокосные системы». – 2014. – № 9; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-9>.

пораженных вирусами растений проводили с помощью аналитического электрофореза в градиентном ПААГ (10-25%) с Ds-Na, используя пластинки (1x160x180 мм), как было описано в работе [1]. Электрофорез в градиентном ПААГ проводили в аппаратах V-20-CDC («Jencons», Англия) и GE-2/4LS («Pharmacia», Швеция) при температуре 4°C, при силе тока 12 мА в течение ночи. На каждую лунку наслаивали 20-50  $\mu$  белка или 4-10 мкг Хл. После разделения полипептидных фрагментов, гелевые пластинки помещали в буфер для окрашивания гелей в течении 1ч. Для обесцвечивания геля после окрашивания его выдерживали в дистиллированной воде при 24°C (комнатной температуре). После этого, гели сканировали на денситометре Ultrosan-2202 («ЛКВ», Швеция), в качестве источника света использовали лазер ( $\lambda=633$  нм). В экспериментах использовали стандартные метчики, изготовленные фирмой «Sigma» (США), с известными молекулярными массами.

## Результаты и их обсуждение

В данной работе в результате маршрутных обследований посевов и насаждений, образцы овощных культур, собранные в регионах Азербайджана, были сгруппированы на основе визуальной диагностики вирусов и проверены тест-системой ИФА. Итак, на основе характерных потенциальных симптомов вирусных заболеваний и тест-системы ИФА были выявлены РНК-геномные вирусы - TMV (*Tomato mosaic virus*) у томата и перца и CMV (*Cucumber mosaic virus*) у огурца, собранных в Гяндже.

Характеристика пигментных систем включает количественное определение в листьях растений хлорофилла а и б, их суммы (а+б) и содержание каротиноидов. Как видно из рис. 1, во всех инфицированных вирусами образцах содержание хлорофиллов а и б (суммарное содержание хлорофилла) имело минимальное значение по сравнению со здоровыми растениями, а в количестве каротиноидов заметной разницы не наблюдалось. В инфицированных РНК-геномными вирусами образцах томата общее содержание хлорофилла снижалось было в 3,89 раза, у перца – в 2,51 раза, у огурца – в 2,67 раза, по сравнению со здоровыми растениями. Уменьшение содержания хлорофилла (Хл а и Хл б) в инфицированных листьях может быть результатом увеличения активности хлорофиллазы или же ингибирования синтеза хлорофилла.

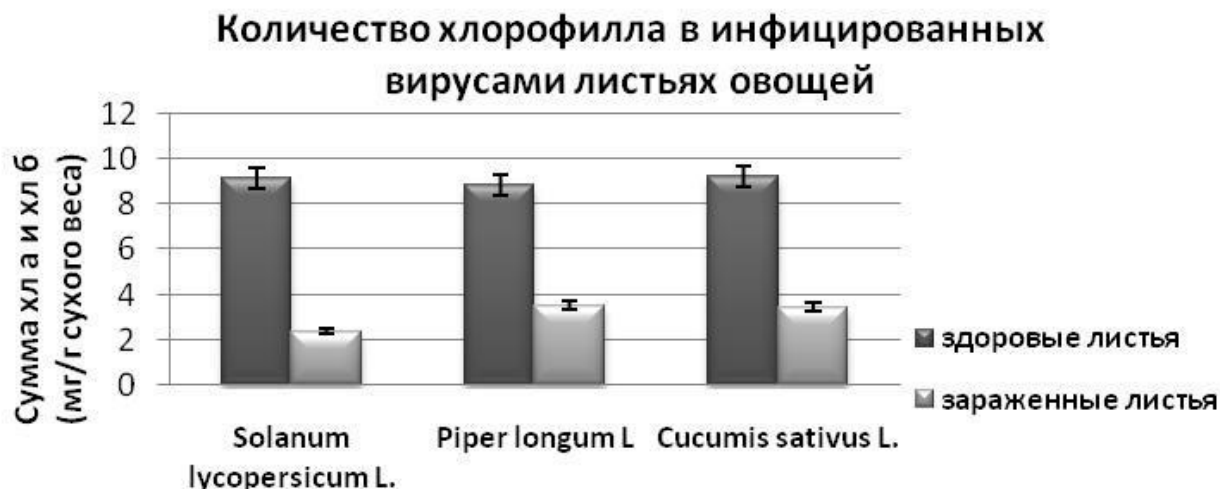


Рис. 1. Количество хлорофилла в инфицированных вирусами листьях овощей.

Тилакоидные мембраны, изолированные из здоровых растений томата и перца, содержали приблизительно 22 полипептида с Mg от 123 до 10 кДа. Инфицирование растений TMV и CMV вызывало существенные изменения в составе и содержании белков хлоропластной мембраны (Рис. 2.).

Как видно из рис. 2. значительно снижался синтез полипептидов в области 47 кДа (ядерный белок ФС II), 33 кДа (белок кислород-выделяющего комплекса), 29-24 кДа (белки светособирающего комплекса ФС II (LHCP II) и 17-15 кДа (периферические белки).

Современные представления заключаются в том, что биотический стресс подавляет фотосинтез, снижает доступность  $\text{CO}_2$  и снижает активность ферментов цикла Кальвина, включая рибулозобифосфат-карбоксилазу (Rubisco). Это приводит к генерации активных форм кислорода при фотосинтетическом переносе электронов: нарушение фиксации  $\text{CO}_2$  подавляет утилизацию НАДФН и создает дефицит  $\text{НАДФ}^+$ , образующиеся АФК подавляют активность фотосистемы II, ее репарацию и влияют на синтез многих белков тилакоидных мембран [7].

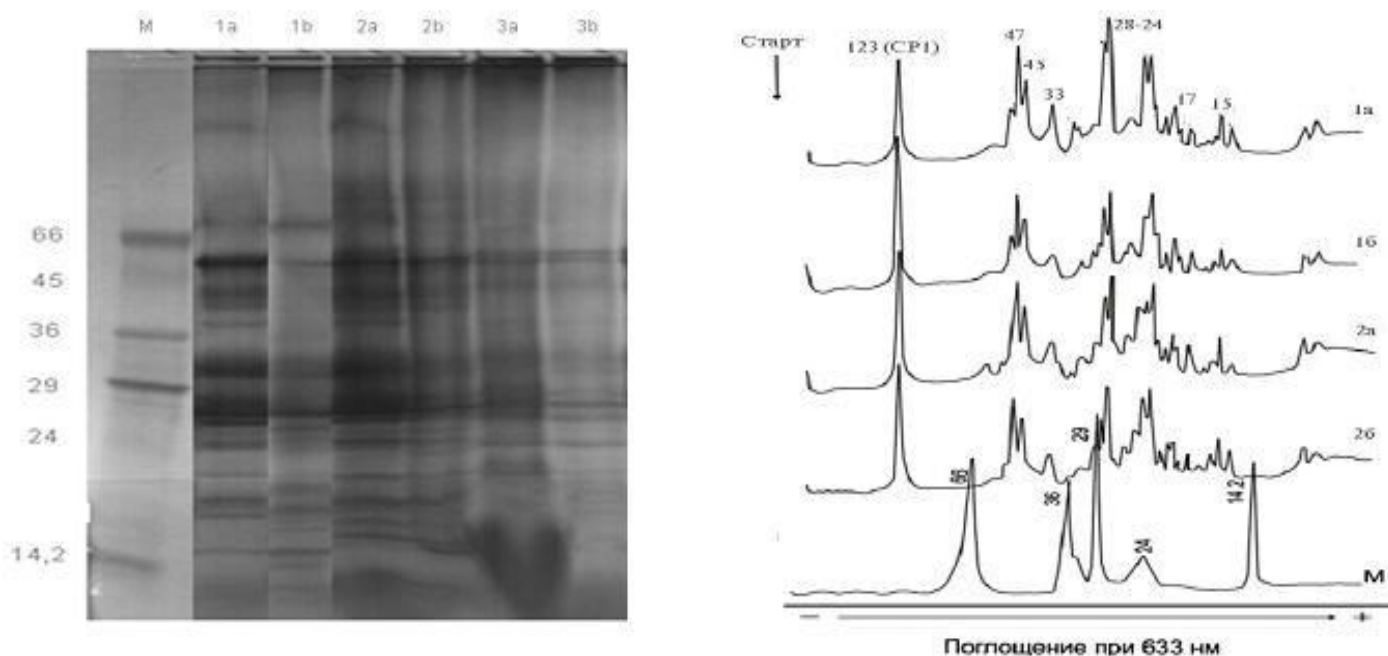


Рис. 2. Электрофоретический анализ и денситограмма белков тилакоидных мембран хлоропластов в 10-25%-ном Ds-Na-ПААГ из растений, инфицированных вирусами. а – незараженные листья; б – зараженные листья; 1 - *Piper longum* L., 2 - *Solanum lycopersicum* L., 3 - *Cucumis sativus* L., М – стандартные белки-маркеры (кДа): бычий сывороточный альбумин (66); яичный альбумин (45); глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (36); карбоангидраза (29); трипсиноген (24);  $\alpha$ -лактальбумин (14,2). На каждую ячейку геля наносили образец, соответствующий 50 мкг белка.

Известно, что 17-15 кДа периферические белки необходимы для нормального функционирования кислород-выделяющего комплекса ФС II. Обнаруженные изменения в структуре пигмент-белкового комплекса ФС II могут быть следствием повреждения хлоропластов или ингибирования белкового синтеза. Такие изменения были связаны с существенным снижением уровня синтеза 33-17 кДа полипептидов. Внешние белки 33 и 17 кДа, связанные с поверхностью тилакоидных мембран, необходимы для оптимального функционирования кислород-выделяющей системы.

Изменения в составе белков между контрольными и стрессовыми вариантами растений, более наглядно, выявлены у растений перца и помидора. Уменьшается также синтез полипептидов светособирающих комплексов LHCP II (в области 29-

24 кДа). Как известно из литературных данных, светособирающие комплексы ЛНС I и ЛНС II, содержащие хлорофиллы *a* и *b*, которые поглощают энергию света и передают ее хлорофиллам *a* кор-комплексов ФС I и ФС II включены в каждый из комплексов фотосистем, и увеличивают, тем самым, поперечное сечение поглощения [3].

Исследования на основе белкового гель-блот анализа, проводимого другими авторами, выявили явные изменения DS9 белка в гене N-зависимого HR в ответ на вирусную инфекцию. При исследовании белкового состава тилакоидных мембран листьев табака NN, инокулированных с TMV (*Tomato mosaic virus*), были выявлены изменения в области 78 кДа белка, образование которого сильно уменьшалось, достигнув минимального уровня. Авторы также утверждают, что TMV инфекция мало влияет на количества DS9 белка [5]. В TMV-инокулированных листьях синтез полипептида в области 72 кДа усиливается. Наиболее вероятным объяснением для инактивации транспорта электронов в ФС II, является то, что соответствующие белки подвергаются разрушению на тилакоидной поверхности. В похожих работах [8] было исследовано воздействие SuCM<sub>0</sub>V вируса на уровень синтеза основных фотосинтетических белков с помощью белкового иммуоблот анализа. Было обнаружено сильное уменьшение синтеза Д1 белка, при котором синтез белков NDH-F и AtpB увеличивался во всех пораженных вирусами образцах растений. Нужно отметить, что на исследуемой автором стадии развития болезни в синтезе белков PsaC и Rubisco значительных изменений не наблюдалось. В работах [2] уровень синтеза белка Д1 и 33 кДа в пораженных вирусом растениях снижался на 47% и 4%, соответственно, по сравнению с контрольными вариантами. Также проведенные исследования в работах Palanisamy et al. (2010) показали, что вирус BYVMV (*Bhendi yellow vein mosaic virus*, family: *Geminiviridae*), приводит к разрушению периферических полипептидов тилакоидных мембран в области 47 и 28-25 кДа, что может сильно влиять на функционирование комплекса ФС II. Как известно из литературных данных, светособирающие комплексы играют важную роль в поглощении света, в тилакоидной укладке и распределении энергии, следовательно любое повреждение этих комплексов будет иметь большие негативные последствия для функционирования фотосинтетической системы. В исследованиях, проведенных разными авторами, наблюдалось заметное сокращение синтеза 28-25 кДа полипептидов и содержание растворимых белков в инфицированных листьях [2]. Уменьшение растворимых белков в инфицированных листьях частично объяснялось повреждением хлоропластов, а также ингибированием синтеза белка. Уменьшение синтеза полипептидов светособирающих комплексов ЛНСР II может



быть причиной потери активности ФС II в зараженных листьях.

В инфицированных листьях также наблюдалось заметное снижение активности фермента RuBPCase [9]. Нужно отметить, что аналогичную ситуацию наблюдали в растениях, выращенных в различных условиях экологического стресса, таких как низкотемпературный стресс и высокая освещенность [2]. Снижение активности RuBPCase фермента может быть связано с уменьшением количества функционирующего RuBPCase белка, синтез которого регулируется на уровне транскрипции [4]. Инфицированные вирусом YVMV листья имели относительно низкую нитратредуктазную активность [5]. Снижение нитратной активности в инфицированных YVMV листьях может быть связано с регуляцией баланса между синтезом нитратов и активации фермента. Изменение во внутриклеточном значении pH вследствие YVMV инфекции может привести к снижению передачи нитратов из пула вакуоли в доступный для фермента активный цитоплазматический пул. Ингибирование нитратредуктазы может быть связано с ингибированием синтеза белка или возможно, с уменьшением фотосинтетического питания в YVMV инфицированных листьях. Нападение насекомых или других патогенов также снижает уровень мРНК, кодирующих малую субъединицу Rubisco, а также генов, кодирующих компоненты антенных комплексов обеих фотосистем [10]. Итак, эксперименты доказывают, что биотические агенты приводят к глобальному снижению экспрессии генов, кодирующих фотосинтетические белки, что является частью базальных защитных реакций. Надо также отметить, что при этом сохраняется транскрипционный ответ на различные биотические стрессы.

## Литература

1. Huseynova I.M., Suleymanov S.Y., Aliyev J.A. Structural-functional state of thylakoid membranes of wheat genotypes under water stress // *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, v.1767, No6, p.869-875. 35.
2. Lenardon S.L., Giolitti F., Leyn A. et al. Effect of Sunflower chlorotic mottle virus infection on sunflower yield parameters // *HELIA*, 2001, v. 24, p. 55–66. 86.
3. Nakano R., Ishida H., Makino A. et al. In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of

- cucumber under chilling-light conditions // *Plant and Cell, Physiology*, 2006, v. 47, p.270–276. 303.
4. Nakano R., Ishida H., Makino A. et al. In vivo fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions // *Plant and Cell, Physiology*, 2006, v. 47, p.270–276. 303.
  5. Palanisamy P., Michael P.I., Krishnaswamy M. Physiological response of yellow vein mosaic virus-infected bhendi [*Abelmoschus esculentus*] leaves // *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 74, 2009, p. 129–133. 194.
  6. Radwan D.E.M., Fayez K.A., Mahmoud S.Y., Lu G. Modifications of antioxidant activity and protein composition of bean leaf due to Bean yellow mosaic virus infection and salicylic acid treatments // *Acta Physiologia Plantarum*, 2010, v. 32, p. 891-904.
  7. Rahoutei J., García-Luque I., Barón M. Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function // *Physiologia Plantarum*, 2000, v. 110, p. 286-292.
  8. Sampol B., Bota J., Riera D., Medrano H. et al. Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines // *New Phytologist*, 2003, v.160, p.403–412. 227.
  9. Zhou Y.H., Yu J.Q., Mao W.H. et al. Genotypic variation on rubisco expression, photosynthetic electron flow and antioxidant metabolism in the chloroplasts of chill-exposed cucumber plants // *Plant and Cell Physiology*, 2006, v. 47, p.192–199. 201. 304.
  10. Zou J., Rodriguez-Zas S., Aldea M. et al. Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, v. 18, p. 1161–1174.