

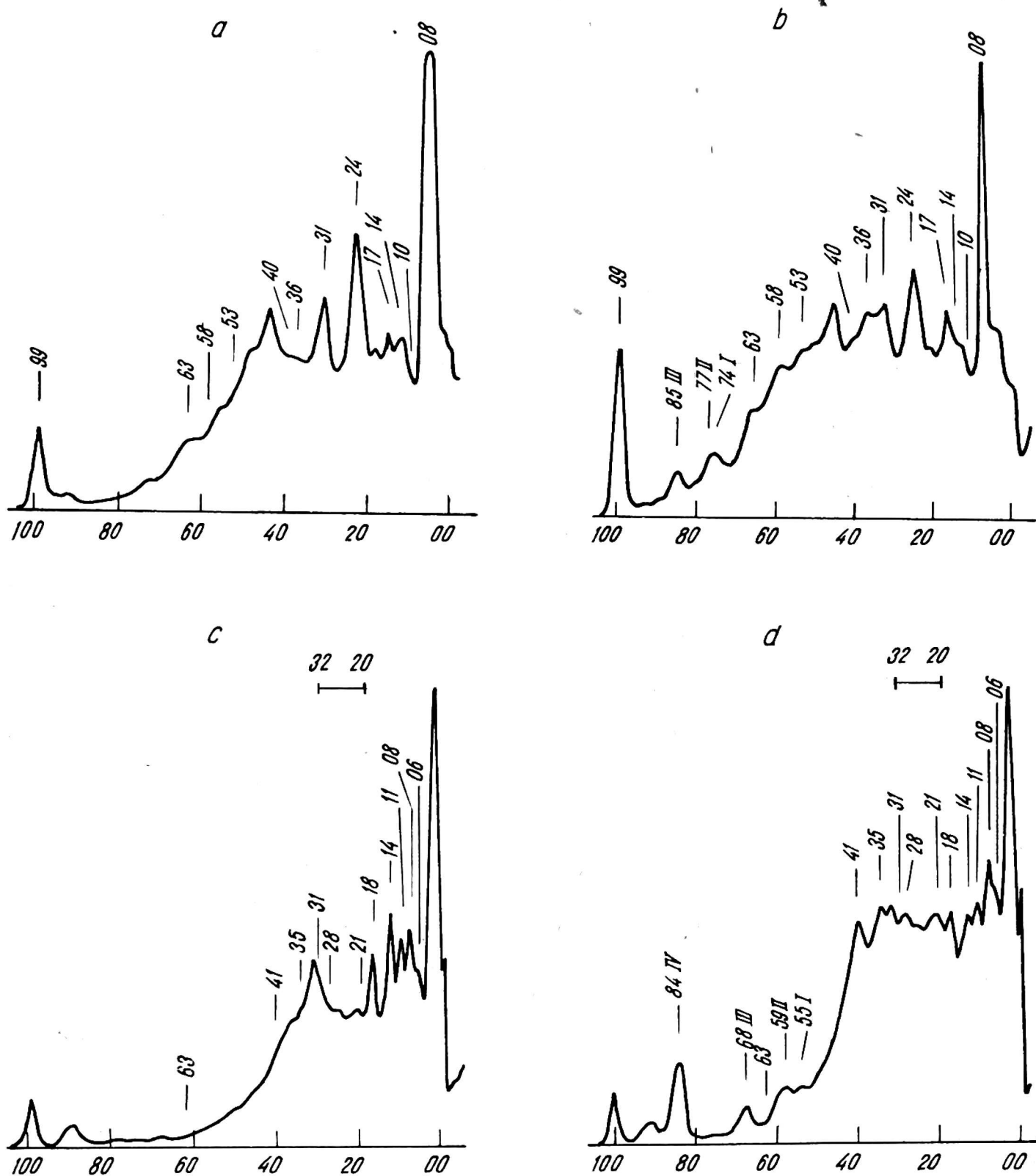
ROLA BIAŁEK W PATOGENEZIE WIRUSOWEJ I REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN

Kazimierz A. Miczyński

Instytut Przyrodniczych Podstaw Produkcji Roślinnej, AR Kraków

Jedną z dróg badania mechanizmów odpornościowych rośliny, ulegających aktywizacji pod wpływem zakażenia wirusowego, jest badanie biochemicznego podłoża patogenyzy i tworzenia się objawów chorobowych. Rodzaj reakcji na porażenie wirusem określa struktura genetyczna zarówno samego wirusa, jak i rośliny gospodarza [16, 18, 46, 53]. Genetyczna informacja, zawarta w kwasach nukleinowych obu tych komponentów reakcji chorobowej objawia się przede wszystkim tworzeniem się w zakażonej komórce specyficznych białek, które są niejako biochemicznym wykładnikiem informacji genetycznej tego układu [8, 9, 14, 16, 46]. Większość badań nad mechanizmami odporności idzie więc obecnie w kierunku wykrywania różnic w składzie białek pomiędzy roślinami zdrowymi a zawirusowanymi określania czy różnice te są specyficzne dla danego wirusa, czy też dla rośliny gospodarza oraz wykrywania ewentualnych korelacji między tymi różnicami a rodzajem występujących objawów chorobowych czy też reakcji odpornościowych w zakażonej roślinie. W tym ostatnim przypadku szczególnie ważne jest stwierdzenie czy powstają jakieś nowe białka o charakterze inhibitorów wirusowych. Pod tym kątem zbadane zostały na przykład dość dokładnie różne odmiany tytoniu *Nicotiana tabacum*, różniące się reakcją na wirus mozaiki tytoniu (WMT), a także różne rasy tego wirusa, dające na tej samej odmianie różne reakcje. Uwagę zwraca się zwykle na frakcję tzw. białek rozpuszczalnych, zawierających większość białek enzymatycznych komórki [9, 12, 13, 30, 45, 51].

Jeżeli mamy do czynienia z odmianami blisko spokrewnionymi różniącymi się jedynie pojedynczymi genami odporności, jak w przypadku odmian *N. tabacum*, posiadającymi gen „N” z *Nicotiana glutinosa*, nadającym im zdolność lokalizowania WMT w miejscach zakażenia oraz później-



Rys. 1. Wykresy densytometryczne elektroforogramów frakcji białek rozpuszczalnych z tytoniu Samsun NN na 7 dzień po infekcji WMT (b, d) lub inokulacji wodą destylowaną (a, c) wykonane z żelach poliakrylamidowych konc. 7,5% (a, b) i 10% (b, c) wg Van Loona

szej nekrotyzacji zakażonych tkanek, to zazwyczaj dostępnymi obecnie metodami analizy fizykochemicznej nie można wykryć żadnych różnic w składzie białek pomiędzy odmianą posiadającą ten gen a jej formą wyjściową, której tego genu brak i w której wirus mozaiki tytoniu mnoży się w zasadzie bez przeszkód [51]. Jednak różnice takie występują na ogół po zakażeniu tych odmian wirusem. U większości dających się rozdzielić

frakcji białkowych stwierdzono w tym przypadku tylko zmiany ilościowe, ale prócz tego udało się wykryć również pewne nowo powstające białka [2, 9, 13, 14, 39, 45, 46, 51, 52]. *A priori* można oczekiwać, na podstawie tego co wiemy obecnie o mechanizmie syntezy wirusów, że winny to być głównie białka wchodzące w skład okrywy białkowej cząstki wirusa (czyli tzw. kapsydu), rozmaite białka enzymatyczne, specyficzne dla tej syntezy jak również niektóre inne białka, mogące być formami pośrednimi w syntezie wirusa, lub też mogące odgrywać rolę substancji odpornościowych, nadając zakażonej roślinie tzw. odporność nabytą lub indukowaną [11, 19, 37]. Skorelowanie występowania takich właśnie białek w badanym preparacie z ich ewentualną rolą odpornościową w organizmie zakażonej rośliny jest zresztą z punktu widzenia metodycznego słabą stroną wszystkich tego typu badań i wywołuje najwięcej kontrowersji przy ich interpretacji.

Metodą elektroforezy na żelach poliakrylamidowych o różnej koncentracji można np. wykryć w roślinach tytoniu *Nicotiana tabacum* odmiany Samsun około 50 rozmaitych białek rozpuszczalnych, przy czym elektrofotogramy odnośnych preparatów otrzymanych z odmian Samsun i Samsun NN (posiadającej gen „N” z *N. glutinosa*) są identyczne chociaż ich reakcja na zakażenie WMT jest różna. Po porażeniu tym wirusem w odmianie Samsun pojawia się jedna nowa frakcja białka o dużej koncentracji, którą zidentyfikowano jako białko kapsydu WMT i które w normalnych warunkach elektroforezy wędruje jako cząsteczka złożona z 3 podjednostek strukturalnych, czyli tzw. trymer. W odmianie Samsun NN można natomiast wykazać już w tydzień po zakażeniu obecność aż 4 nowych białek o stosunkowo niskim ciężarze molekularnym (4000-10 000 daltonów). Białka te, wykrywalne pierwotnie w liściu inokulowanym, po pewnym czasie (około 3 tygodni) można wykryć też w innych liściach (rys. 1) nie porażonych wirusem [13, 14, 51].

Analogiczne analizy, przeprowadzone przez Van Loona [52] na gatunku *Nicotiana glutinosa* wykazały, że zakażenie WMT silnie stymuluje tutaj syntezę jednej nowej frakcji białka oraz zanik dwóch innych. Żadna z nich jednakże nie jest identyczna z nowymi białkami, które powstają w odmianie Samsun NN i dlatego nie można ich uważać za produkt genu „N”, pochodzącego z *N. glutinosa*. Tezę tę potwierdziły później doświadczenia, w których odmiana Samsun zakażona została szczepem HR wirusa mozaiki tytoniu (szczep Holmes rib-grass), który daje na liściach tej odmiany objawy typu półukładowego w postaci żółtych pierścieni. W tej kombinacji można było wykryć w ekstraktach zarówno białko kapsydu jak i 4 nowe białka, pojawiające się w odmianie Samsun NN po zakażeniu zwykłym szczepem mozaiki.

Porażenie odmiany Samsun NN w.w. szczepem WMT charakteryzuje się ponadto znacznymi zmianami ilościowymi wielu białek, szczególnie wysokomolekularnych, które w małym tylko stopniu występują w przy-

padku infekcji systemicznej. Intensywność tych zmian idzie zwykle w parze ze stopniem nekrotyzacji zakażonej tkanki [2, 8, 9, 12, 43, 44, 52].

Dalszym dowodem na zależność zmian w składzie białek rozpuszczalnych od rodzaju reakcji rośliny na porażenie wirusem były analizy roślin odmiany Samsun NN, pozostających po zakażeniu WMT w temperaturze 32°C. W tej temperaturze, rośliny te wykazują objawy porażenia układowego lecz równocześnie nie występuje synteza owych 4 białek, charakterystycznych dla reakcji nekrotycznej. Zwiększa się natomiast wyraźnie synteza białka kapsydu, które nagromadza się w komórce nie wiążąc się w cząsteczki wirusowe [14, 52, 54]. Niektóre inne wirusy, jak wirus nekrozy tytoniu, wirus kędzierzawki nekrotycznej ziemniaka i ostry szczep wirusa Y ziemniaka, wywołują również zmiany nekrotyczne na zakażonych liściach tytoniu Samsun, stymulując równocześnie syntezę charakterystycznych frakcji białek. Obecność tych frakcji udało się również stwierdzić w przypadku zakażenia wirusem mozaiki ogórka, aczkolwiek w bardzo małym stężeniu, nie występowały one natomiast w ekstraktach z roślin, porażonych wirusem X ziemniaka, który opanowuje wymienione odmiany tytoniu układowo i nie daje zmian nekrotycznych [52].

Można stąd wnioskować, że w reakcji WMT - tytoń zmiany występujące w składzie białek rozpuszczalnych związane są z rodzajem objawów oraz określane w zasadzie przez genotyp rośliny-gospodarza.

Jest rzeczą interesującą, że nekrozy liścia spowodowane mechanicznymi uszkodzeniami lub oparzeniem powodowały jedynie pewne ilościowe zmiany w składzie białek, nigdy jednakże nie zauważono w takich przypadkach występowania jakichś nowych frakcji. W Samsun NN frakcje te pojawiały się po zakażeniu najpierw w liściach inokulowanych, ale nie równocześnie. Najwcześniej, bo już po około 4 dniach po inokulacji wirusem, można było wykryć obecność frakcji o stosunkowo najwyższym ciężarze cząsteczek (nr I na rys. 1), a dopiero później pojawiały się pozostałe.

Traktowanie roślin aktynomycyną D w dwa dni po inokulacji WMT zmniejszało wybitnie intensywność nowych pasm białek na elektroforogramach [32, 52].

Jak wykazały dodatkowe badania, te 4 nowe komponenty spektrum białek nie są izoenzymami ponad 30 różnych enzymów, których obecność stwierdzono w badanych preparatach. Pomimo iż znaleziono korelację między stężeniem tych białek a stopniem odporności indukowanej przez wirus w zakażonej tkance nie udało się stwierdzić ich bezpośredniego działania inhibicyjnego na wirus po wymyciu odnośnych frakcji z żelu po elektroforezie, ani też wywołać w roślinie stanu indukowanej odporności przez ich aplikację do liścia na 24 godzin przed zakażeniem WMT [52].

Fracjonowanie na sephadexie ekstraktów z zawirusowanych roślin

Samsun NN ujawniło dodatkowo 8 nowych białek, które w preparatach nieoczyszczonych występowały jako zmiany ilościowe [52]. Migrowały one w elektroforezie wolniej aniżeli tamte 4 frakcje, ale ich masy cząsteczkowe nie przekraczały 20 000 daltonów. Jedyne nowe izoenzymy, które udało się wyodrębnić i zidentyfikować w liściach z objawami plamek nekrotycznych (liście inokulowane wirusem) były to rybonukleazy i peroxydazy [8, 46, 52].

Wg danych Gianinazzi [13] nowe komponenty białek można też wykryć w liściach odmian Samsun lub Xanthi reagujących porażeniem układowym na zakażenie WMT, ale dopiero wówczas, gdy mnożenie wirusa w nich się zakończy lub ulegnie zwolnieniu, zwłaszcza zaś w stadium kwitnienia tych roślin. Wydaje się więc, że zarówno w roślinach nadwrażliwych na wirus jak i tych, które ulegają porażeniu układowemu, pojawienie się tych nowych białek może być związane z zahamowaniem syntezy wirusa, co przypomina działanie interferonu w komórkach zwierzęcych [38].

Czy zatem omówione powyżej nowo powstające w zawirusowanej roślinie białka są rzeczywiście interferonem *sensu stricto*? Pytanie to od wielu lat interesuje badaczy, zajmujących się mechanizmem odporności roślin na choroby wirusowe i właściwie do tej pory nie mamy na nie jasnej odpowiedzi. Poczynając od pierwszych prac Rossa i współpracowników w latach sześćdziesiątych nad zjawiskiem odporności indukowanej [3, 34-36, 50], opisano już wiele przypadków izolowania z roślin zawirusowanych substancji antywirusowych, które przeważnie charakteryzowano jako białka [1, 4, 22-24, 26, 29, 40-42]. Nie we wszystkich jednakże przypadkach indukcji odporności substancje takie dało się wyizolować, być może wskutek niedoskonałości stosowanych technik, gdyż związki te na ogół są bardzo labilne i łatwo ulegają denaturacji. Substancje te wyodrębniane były z różnych gatunków roślin, zarówno z tych, które na zakażenie WMT reagują lokalnymi nekrozami, jak i z takich, które ulegają porażeniu układowemu (datura, tytoń, pomidory). Ich ciężary cząsteczkowe we wszystkich znanych przypadkach mieściły się w przedziale 20 000-60 000 daltonów. Oznacza to, że różnią się one dość znacznie wielkością cząsteczek od uprzednio omawianych białek, specyficznych dla reakcji nadwrażliwościowej.

Podobne natomiast wielkości znaleziono dla białek interferonu z komórek zwierzęcych [7, 24]. Także i pewne inne cechy fizykochemiczne tych substancji wykazują analogie z interferonem jednakże z drugiej strony istnieją też zasadnicze różnice. Dotychczas przebadane antywirusowe substancje roślinne o charakterze interferonu różnią się od tego ostatniego przede wszystkim niespecyficnością działania w stosunku do tkanek (gatunków roślin), z których zostały otrzymane, gdyż hamują infekcję wirusową również na innych gatunkach, a ponadto mają zdolność przemieszczania się daleko poza miejsce pierwotnego zakażenia w roś-

linie [27, 37]. Zarazem jednakże okazało się, że podobnie jak w przypadku interferonu w komórkach zwierzęcych, tak i tutaj, analogiczne substancje mogą być indukowane w roślinie przez czynniki niewirusowe, a więc różnego rodzaju polianiony, jak np. RNA, fityna, polinukleotydy i inne organiczne polimery [15, 21, 27, 47, 48]. Stwierdzono np., że podobnie jak to się dzieje w przypadku zakażenia WMT, iniekcja specyficznych polianionów do liści Xanthi Nc. (odmiana nadwrażliwa na WMT) uodpornia je na zakażenie tym wirusem, indukując jednocześnie syntezę charakterystycznych frakcji białkowych [55]. Obie te reakcje nie występują w temperaturze 32°C. Jednakże gdy tak potraktowaną roślinę przeniesiemy z powrotem do temperatury 20°C, odporność jej na zakażenie TMV jak również synteza odnośnych białek ulegają reaktywacji. Polianiony wywierają z kolei tylko nieznaczny wpływ na odporność tej odmiany tytoniu na wirus mozaiki utajonej X ziemniaka, który jak wiadomo poraża ją systemicznie, natomiast indukują odporność niemal zupełną na wirusy dające reakcję nadwrażliwości jak TMV i TNV (wirus nekrozy tytoniu). Prawdopodobnie iniekcja polianionu aktywuje ten sam mechanizm odpornościowy rośliny, który ogranicza rozprzestrzenianie się wirusa z miejsca zakażenia w przypadku reakcji nadwrażliwościowej.

Syntezę zarówno interferonu w komórkach zwierzęcych, jak i odporność przeciwwirusową u roślin, zdolne są indukować jedynie polimery o silnych ładunkach negatywnych, nie ma natomiast zgodności poglądów co do efektu wielkości cząsteczek danego polimeru w tych dwóch różnych typach komórek. Wydaje się, że w komórkach roślinnych silniejszym działaniem odznaczają się polianiony o stosunkowo niskim ciężarze molekularnym, podczas gdy w komórkach zwierzęcych sytuacja jest odwrotna [6, 10, 55].

Jeżeli zdolność do indukowania odporności jest cechą cząsteczek, zawierających w swej strukturze sekwencję ujemnych ładunków, wówczas zakażenie każdym wirusem, posiadającym takie cząsteczki winno indukować odporność na wtórne zakażenie. Gianinazzi i Kassanis wykazali w związku z tym [20], że 5 różnych serologicznie wirusów, które porażają odmianę tytoniu Xanthi Nc. systemicznie, a to: wirus Y ziemniaka, wirus X ziemniaka, wirus mozaiki ogórka, wirus mozaiki lucerny oraz aukuby ziemniaka, zwiększały jednocześnie jego odporność na wtórne porażenie WMT. Odporność ta występowała jednak dopiero po około 3 tygodniach po zakażeniu i wówczas pojawiały się również 3 specyficzne, niskomolekularne białka, analogiczne do tych, które zaobserwowano w przypadku zakażenia WMT. Stężenie ich nie było jednakże skorelowane ze stopniem odporności nabytej.

W odróżnieniu od odporności indukowanej wirusem, odporność indukowana polianionami zlokalizowana jest wyłącznie w tkance, która bezpośrednio poddana została ich działaniu [47]. Prawdopodobnie odporność ta powstaje jako rezultat migracji jakiejś niskomolekularnej substancji,

która rozprzestrzenia się z miejsca inokulacji wirusa do innych części rośliny, indukując tam produkcję białek o charakterze interferonu, a która w przypadku aplikacji polianionów nie jest w ogóle produkowana, lub też powstaje jedynie w bardzo małych ilościach [37, 55].

Ciekawe są w związku z tym doświadczenia nad działaniem kwasu fitynowego (inosyto-heksafosforowego), jako czynnika indukującego odporność antywirusową u roślin [56]. W roślinach odmiany Xanthi Nc., traktowanych tym kwasem stwierdzono powstawanie specyficznego białka o masie cząsteczkowej około 30 000 daltonów, którego działanie można już było wykryć po ± 3 dniach od momentu podania fityny, ale tylko wówczas jeżeli rośliny hodowane były w warunkach długiego dnia. Białko podane roślinie przed zakażeniem TMV wywoływało u niej pewną odporność na infekcję. Jego działanie nie wywierało też żadnego efektu hamującego na wirus żółtej mozaiki rzepy (TYMV) inokulowany na kapustę chińską i odwrotnie ekstrahowane z tej rośliny, poddanej uprzednio działaniu fityny, nie wywierało żadnego efektu inhibicyjnego na TMV przy teście na tytoniu Xanthi Nc. Być może spowodowane to jest odrębną strukturą cząstek obu tych wirusów.

Na podstawie przytoczonych powyżej danych można stwierdzić, że infekcja wirusowa, jak również aplikacja pewnych polianionów, stymulują w roślinie syntezę specyficznych białek, których obecność w większym lub mniejszym stopniu wiąże się ze stanem odporności nabytej rośliny. Są to białka zarówno o stosunkowo niskim ciężarze molekularnym (poniżej 10 000 daltonów), jak i wyższym (do około 60 000). Po wyodrębnieniu z tkanki roślinnej, jednakże tylko te o wyższej masie cząsteczkowej, wykazywały jakiś efekt inhibicyjny w stosunku do badanych wirusów. Warto jednakże tu nadmienić, że ostatnio Ragetli wyodrębnił z goździków białko o ciężarze molekularnym około 10 000 daltonów, które okazało się bardzo silnym inhibitorem w stosunku do różnych wirusów [33]. Z drugiej strony wykryto też białka o jeszcze mniejszych cząsteczkach (3000-6000), będące inhibitorami niektórych enzymów [28].

Jak już wspomniano uprzednio słabą stroną interpretacji badań nad działaniem inhibitorów wirusowych jest metodyka. Na największe trudności napotykałyśmy wówczas, gdy chcemy ustalić jakąś przyczynową zależność między substancjami syntetyzowanymi przez roślinę po zakażeniu wirusem, a ich ewentualną rolę jako czynników ograniczających mnożenie się tego wirusa w zakażonej roślinie. Najczęściej używaną techniką jest badanie hamowania zakaźności wirusa przez odnośne preparaty, co daje oczywiście tylko bardzo powierzchowny wgląd w istotę rzeczy. Przebadanie tych substancji jako inhibitorów namnażania się wirusa w roślinach *in vivo* jest często bardzo trudne z uwagi na to, że nie wiemy w jakim stopniu przenikają one do komórek. Pewne nowe perspektywy dla tych badań otwiera tu zastosowanie protoplastów roślinnych.

System protoplastów jest specjalnie korzystny dla studiów syntezy

wirusowej, bo można otrzymać stosunkowo łatwo homogeną populację protoplastów, która następnie może być zakażona wirusem w sposób synchroniczny i to z dużą wydajnością — do około 70% [32, 49]. Szybkie jest tu pobieranie rozmaitych prekursorów syntezy i można ściśle kontrolować jej przebieg. W protoplastach otrzymanych z tytoniu *Xanthi* maksymalną koncentrację wirusa WMT osiąga się po około 24 godz. inkubacji w temperaturze 28°C, a po 72 godz. w temperaturze pokojowej. W odpowiednio optymalnych warunkach hodowli poziom ten utrzymuje się przez dłuższy czas bez jakichś widocznych objawów degeneracji protoplastów.

Stosując technikę prekursorów radioaktywnych syntezy białek, przy stosunkowo krótkim czasie ich znakowania, w połączeniu z elektroforezą i autoradiografią uzyskanych elektroforogramów udało się w ostatnich latach uzyskać pewien wgląd w syntezę specyficznych dla wirusa białek, powstających w pierwszych stadiach po zakażeniu. Wyniki uzyskane na ten temat (niezależnie od siebie) w kilku laboratoriach pracujących bądź to na całych roślinach, bądź na wyizolowanych z nich komórkach mezofylu lub protoplastach, jak również w systemach bezkomórkowych *in vitro*, na ogół pokrywają się ze sobą i posłużyły ostatnio do sformułowania bardzo ciekawej hipotezy syntezy WMT [32, 39, 45]. Stwierdzono mianowicie, że w pierwszych chwilach po zakażeniu w tytoniu *Xanthi* wzrasta synteza niemal wszystkich rodzajów białek a ponadto pojawiają się 4 nowe białka o ciężarach molekularnych kolejno: $17,5 \times 10^3$, 135×10^3 , 165×10^3 i 245×10^3 . Oprócz tego pierwszego, zidentyfikowanego jako białko kapsydu wirusa i występującego w największej ilości, bo około 12%, pozostałe białka reprezentują prawdopodobnie różne formy replikazy WMT. Występują one w niejednakowych ilościach w granicach 0,25-1%, wszystkich białek rozpuszczalnych. Aktywność replikazy została stwierdzona dla frakcji 135×10^3 .

Cząsteczka o największej masie wykryta została tylko w bardzo wczesnym stadium po zakażeniu. Reprezentuje ona przypuszczalnie produkt translacji całej molekuly wirusowego RNA, którego ciężar molekularny $= 2 \times 10^6$ zawiera dostateczną ilość informacji dla kodowania białka tej wielkości. Jest to replikaza nr 1, która syntetyzuje ujemną nić (minus strand) wirusowego RNA w procesie jego namnażania w komórce. Następna z kolei cząsteczka o ciężarze 165×10^3 , to replikaza nr II, która jest właściwą polimerazą RNA. Białko to posiada dołączoną na jednym końcu łańcucha peptydowego cząstkę białka okrywy wirusa, co określa jego specyficzność do syntezy dwuniciowych struktur RNA wirusowego, będącego, jak wiemy przejściową formą w syntezie TMV-RNA. Trzecia z kolei frakcja o masie $= 135 \times 10^3$ jest właściwie identyczna z poprzednią z tą różnicą, że brak jej cząsteczki deczepionego białka kapsydu. Jest to replikaza nr III, która najprawdopodobniej syntetyzuje RNA informacyjny (mRNA) do syntezy białek kapsydu. Obecność takiego RNA wy-

kryto w rzeczywistości w zakażonych WMT tytoniach, określając jego ciężar cząsteczkowy na 350 000 daltonów.

Do sformułowania wspomnianej hipotezy posłużyły dane o występowaniu powyższych białek w połączeniu z zebranymi równocześnie danymi o występowaniu w zawirusowanym tytoniu cząsteczek RNA o różnej wielkości. Jeżeli przyjmiemy, że cząsteczki te powstają przez rozpad WMT-RNA (RNA wirusa) w określony sposób, wówczas można sobie wyobrazić, że wirusowe RNA po spełnieniu roli informatora (mRNA) dla syntezy polimerazy I rozpada się na dwie części o wielkościach kolejno: $1,65 \times 10^6$ i $0,35 \times 10^6$ daltonów. Większa cząsteczka, powstała z tego rozpadu rozkłada się następnie na dwie cząstki o masach: $1,35 \times 10^6$ i znowu $0,35 \times 10^6$ daltonów, przy czym rozpady te zachodziłyby bez udziału enzymów specyficznych, a jedynie pod wpływem zawartej w układzie rybonukleazy.

RNA o ciężarze $1,65 \times 10^6$ spełnia rolę mRNA (RNA informacyjnego) dla syntezy replikazy nr II, RNA o cząsteczkach: $1,35 \times 10^6$ — podobną rolę dla syntezy replikazy II, a RNA o cząsteczkach wielkości $0,35 \times 10^6$ daltonów jest RNA informacyjnym dla syntezy wirusowego kapsydu. Schemat ten wyjaśnia dość precyzyjnie dlaczego wymienione białka występują w zakażonych tkankach w rozmaitych ilościach i dlaczego pojawiają się nie równocześnie. Jest rzeczą znamioną, że analizy te nie wykazały obecności żadnych nowych białek niskomolekularnych, charakterystycznych dla omawianych poprzednio reakcji odpornościowych. Jedną z przyczyn jest niewątpliwie fakt, który ostatnio nieco zaskoczył badaczy, a mianowicie, że izolowane komórki i protoplasty z odmian tytoniu, reagujących na zakażenie TMV objawami nadwrażliwości zachowują się po infekcji tym wirusem zupełnie tak samo jak pokrewne odmiany wrażliwe. Nie obserwuje się w nich charakterystycznego zahamowania namnażania wirusa, nie występują żadne zmiany nekrotyczne ani też towarzyszące im zwykle stymulacje aktywności wielu enzymów [17, 31]. Niewątpliwie działanie genu „N” uwarunkowane jest tu koniecznością zachowania struktury tkankowej i wzajemnego oddziaływania wielu komórek. Podobną zresztą sytuację wykryto ostatnio w tytoniach reagujących na WMT porażeniem systemicznym. Jak wiadomo, liście takich roślin z objawami wyraźnej mozaiki, charakteryzują się m.in. nierównomiernym opanowaniem przez wirus, który nagromadza się niemal wyłącznie w partiach mesofyłu, wykazujących chlorotyczne zmiany. Te części natomiast, które są intensywnie zielone, praktycznie wirusa nie zawierają. Otóż okazało się, że gdy z takich intensywnie zielonych liści wyizolować protoplasty następuje w nich wkrótce silne namnażanie się wirusa, który osiąga koncentrację analogiczną do komórek z żółtych części liści. Niewątpliwie i tutaj odporność pierwotna komórek „zielonych” uwarunkowana jest strukturą tkankową liścia i zanika z chwilą zniszczenia tej struktury.

LITERATURA

1. Antignus Y., Sela I., Hauschner A.: An antiviral factor from virus infected plants. Standardisation of crude preparations for biological assay. *Phytopath. Z.*, 1971, t. 70, s. 345-350
2. Bates D. C., Chant S.R.: Alterations in peroxidase activity and peroxidase isozymes in virus infected plants. *Ann. appl. Biol.*, 1970, t. 65, s. 105-110
3. Bozarth R. F., Ross A. F.: Systemic resistance induced by localised virus infections; extent of changes in uninfected plant parts. *Virology*, 1964, t. 24, s. 446-455
4. Chadha K. C., McNeill B. H.: An antiviral principle from tomatoes systemically infected with tobacco mosaic virus. *Can. J. Bot.*, 1969, t. 47, s. 531-518
5. Davis R. E., Ross A. F.: Increased hypersensitivity induced in tobacco by systemic infection by potato virus Y. *Virology*, 1968, t. 34, s. 509-520
6. De Clerq E., Eckstein F., Merigan T. C.: Structural requirements for synthetic polyanions to act as interferon inducers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1970, t. 173, s. 444-461
7. Fantes K. H.: Purification, concentration and physico-chemical properties of interferons. In N. B. Finter ed. „Interferons” North Holland Publ., Amsterdam 1966, s. 119-180
8. Farkas G. L.: in *Biochemical regulation in diseased plants or injury* (Hirai T., Hidaka Z., Uritani I. ed.), Tokyo 1968, s. 123-135
9. Farkas G. L., Stahman M. A.: On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. *Phytopath.*, 1966, t. 56, s. 669-677
10. Field A. K., Tytell A. A., Lampson G. P., Hilleman M. R.: Inducers of interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc. Nat. Acad. Sci. US.*, 1967, t. 58, s. 1004-1010
11. Finter N. B. ed.: *Interferon and interferon inducers*. North Holland publ. Co. Amsterdam 1973
12. Fritig B., Gosse J., Legrand M., Hirth L.: Changes in phenylalanine ammonia lyase during hypersensitive reactions of tobacco to TMV. *Virology*, 1973, t. 55, s. 371-379
13. Gianinazzi S., Martin C., Vallée J. C.: Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n. c. Apparition des nouvelles macromolécules lors de la repression de la synthèse virale. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 1970, t. 270, s. 2383-2386
14. Gianinazzi S., Vallée J. C., Martin C.: Hypersensibilité au virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* Nc. *C. R. Acad. Sci.*, Paris 1969, t. 268, s. 800-802
15. Gicherman G., Loebenstein G.: Competitive inhibition by foreign nucleic acid and induced interference by yeast RNA with the infection of tobacco mosaic virus. *Phytopath.*, 1968, t. 58, s. 405-409
16. Hadwiger L. A., Schwochau M. E.: Resistance mechanisms — an induction hypothesis. *Phytopath.*, 1969, t. 59, s. 223-226
17. Juergen-Hansen A.: Systemic tobacco mosaic virus infection of a „resistant” N-gene carrying tobacco hybrid raised from infected callus tissue. *Virology*, 1974, t. 57, s. 387-391
18. Holmes F. O.: Genetics of pathogenicity in viruses and of resistance in host plants. *Adv Virus Res.*, 1965, t. 11, s. 139-161
19. Isaacs A.: Interferon. *Adv. Virus Res.*, 1963, t. 10, s. 1-35
20. Kassanis B., Gianinazzi S., White R. F.: A possible explanation of the resistance

- of virus infected tobacco plants to second infection. J. gen. Virol., 1974, t. 23, s. 11-16
21. Lampson G. P.: Inducers of interferon and host resistance. I. Double stranded RNA from extracts of *Penicillium funiculosum*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1967, t. 58, s. 782-789
 22. Loebenstein G.: Further evidence on systemic resistance induced by localised, necrotic virus infections in plants. Phytopath., 1963, t. 53, s. 306-308
 23. Loebenstein G., Van Praagh T.: Extraction of a virus interfering agent induced by localised and systemic infection. Symposium on Host-Parasite Relations in Plant Pathology, Budapest 1964, s. 53-58
 24. Loebenstein G., Rabina S., Praagh T.: Induced interference phenomena in virus infections. in: „Viruses of plants”, ABR Beemster and J. Dijkstra ed. North Holland publ., Amsterdam 1966, s. 151-157
 25. Loebenstein G., Lovrekovich L.: Interference with tobacco mosaic virus local lesion formation in tobacco by injecting heat-killed bacteria of *Pseudomonas syringae*. Virology, 1966, t. 30, s. 587-591
 26. Loebenstein G., Ross A. F.: extractable agent induced in uninfected tissues by localised virus infections, that interferes with infection by tobacco mosaic virus. Virology, 1963, t. 20, s. 507-517
 27. Maia E.: Induction de synthèse d'un facteur antiviral chez le tabac et la *Datura* par application d'acide phytique. CR. Acad. Sci., Paris, 1966, t. 262, s. 2099-2101
 28. Misawa M., Sakato A., Tanaka H., Hayashi M., Sameyima H.: Production of physiologically active substances by plant cell suspension cultures. Proc. 3d Congress of Plant Tissue and Cell Culture Association, Leicester 1974, Abstr. no 17.
 29. Nagaich B.B., Sabhajeet Singh.: An antiviral principle induced by potato virus X infection in *Capsicum pendulum* Willd. Virology, 1970, t. 40, s. 267-271
 30. Novacky A., Hampton R. E.: Peroxidase isozymes in virus infected plants. Phytopath., 1968, t. 58, s. 301-305
 31. Otsuki Y., Shimomura T., Takebe I.: Tobacco mosaic virus multiplication and expression of the „N” gene in necrotic responding tobacco varieties. Virology, 1972, t. 50, s. 45-50
 32. Paterson R. M. — Informacja ustna.
 33. Ragetli H. W. J. — Informacja ustna.
 34. Ross A. F.: Localised acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts., Virology, 1961. t. 14, s. 329-339
 35. Ross A. F.: Systemic acquired resistance induced by localised virus infections in plants.: Virology, 1961, t. 14, s. 340-358
 36. Ross A. F.: Systemic resistances induced by localised virus infections in beans and cowpeas. Phytopath., 1964, t. 54, s. 1436.
 37. Ross A. F.: Systemic effects of local lesion formation. In „Viruses of Plants” Beemster A.B.R. and Dijkstra J. eds. North-Holland publ., Amsterdam 1966, s. 127-150
 38. The interferons, Ed. by G. Rita, Acad. Press, New York 1968
 39. Sakai F., Takebe I.: A non-coat protein synthesised in tobacco mesophyll protoplasts injected with tobacco mosaic virus. Molec. gen. Genetics. 1972, t. 118, s. 93-96
 40. Sander E.: Antiviral activity of substances isolated from virus infected and non infected tobacco leaves. Proc. 3d Congress of Plant Pathology, 1973, Minnesota, Abstr., no 0292
 41. Sela I., Harpaz I., Birk J.: Separation of a highly active antiviral factor from virus infected plants. Virology, 1964, t. 22, s. 446-451

42. Sela I., Harpaz I., Birk J.: Suppression of virus infectivity in diseased plant tissue following treatment with an antiviral factor from virus infected plants. *Virology*, 1965, t. 25, s. 80-82
43. Simons T. J., Ross A. F.: Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco, *Phytopath.*, 1970, t. 60, s. 383-384.
44. Simons T. J., Ross A. F.: Metabolic changes associated with systemic induced resistance to tobacco mosaic virus in Samsun NN tobacco. *Phytopath.*, 1971, t. 61, s. 293-300
45. Singer B.: Protein synthesis in virus infected plants. *Virology*, 1971, t. 46, s. 247-255
46. Stahman M. A., Woodbury W., Loverekovich L., Macko V.: In Proceedings of the International Symposium on Plant Biochemical Regulation in Viral and other diseases or injury. Tokyo 1967. s. 263-274
47. Stein A., Loebenstein G.: Induced interference by synthetic polyanions with the infection of tobacco mosaic virus. *Phytopath.*, 1972, t. 62, s. 1461-1466
48. Stein A., Loebenstein G.: Induction of resistance to tobacco mosaic virus by poly-I and poly-C in plants. *Nature*, 1970, t. 226, s. 363-364
49. Takebe I., Otsuki Y.: Infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1969, t. 64, s. 843-848
50. Yoshizaki T.: On the inhibitory effect induced by tobacco mosaic virus in *Phaseolus vulgaris* plants. *Japan. J. Microb.*, 1966, t. 10, s. 85-91
51. Van Loon L. C., Van Kammen A.: Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 1970, t. 40, s. 199-211
52. Van Loon L. C.: Pathogenese en symptomexpressie in viruszieke tabak. Wageningen, 1972
53. Miczyński K. A. Z nowszych poglądów na zagadnienie odporności roślin na choroby wirusowe. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1971, t. 115, s. 13-23
54. Sarkar S., Jockusch H.: Wild types and defective coat proteins of tobacco mosaic virus: Electrophoretic analysis of plant extracts in polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, t. 106, s. 259-261
55. Gianinazii S, Kassanis B.: Virus resistance induced by polyacrylic acid. *J. gen. Virol.*, 1974, t. 23, s. 1-9

Казимеж А. Мичиньски

РОЛЬ БЕЛКОВ В ВИРУСНОМ ПАТОГЕНЕЗЕ И ИММУНОРЕАКЦИЯХ РАСТЕНИЙ

Резюме

В работе представлены новые достижения и гипотезы, касающиеся роли специфических белков, образующихся в растительном организме вследствие вирусной инфекции — в процессе патогенеза и связанных с этим явлений индуцированной устойчивости. Растения пораженные вирусом обнаруживают заметные изменения в составе растворимых белков клетки — как количественно, так и качественно, по сравнению со здоровыми растениями. Эти изменения особенно сильно проявляются в случае сверхчувствительной реакции на поражение

вирусом, в то время когда размножение вируса в зараженной ткани подвергается торможению и появляются некрозы. Образующиеся при этом новые белки относительно низкой молекулярной массы характерны для данного вида растения. Аналогичные белки также обнаружены в случае индуцирования в растения устойчивости путем применения различного типа полианионов. Однако как одни, так и другие не действуют тормозяще на заразительность вирусных препаратов в тестах *in vitro*. Такое действие (неспецифическое по отношению к данному вирусу) наблюдается, как правило, в случае белков больших молекулах (ок. 20 000-60 000 дальтонов), которые в нескольких случаях удалось также изолировать из растений зараженных вирусами. До сего времени не известно выполняют ли и в какой степени все вышеперечисленные белки какуюлибо активную роль в индуцировании противовирусной устойчивости в растительном организме *in vitro*. Они правда обладают рядом признаков свойственных белкам интерферона из животных клеток, но в других отношениях довольно значительно отличаются также от этих последних.

В первой стадии после заражения в клетках листьев табака, зараженных ВМТ, можно еще обнаружить несколько других белков, относительно высокой молекулярной массы (свыше 100 000 дальтонов). Некоторые доказательства указывают на то, что это разные формы полимеразы ВМТ.

Kazimierz A. Miczyński

THE ROLE OF PROTEINS IN PATHOGENESIS AND RESISTANCE PHENOMENA IN VIRUS DISEASED PLANTS

Summary

The paper deals with new scientific achievements and hypotheses concerning the role of specific, virus-induced proteins in the process of pathogenesis and acquired resistance in virus diseased plants.

Virus infection induces in the infected plant considerable quantitative and qualitative changes in the composition of its soluble proteins. Such changes are especially evident in the case of a hypersensitive reaction, when the process of virus multiplication is inhibited and followed by necrotisation of the invaded tissue. New, low molecular proteins, which are synthesised in such conditions in infected plants are characteristic for the genome of the host plant. Synthesis of similar proteins can be also induced by treatment with different polyanions. However both types of those proteins have no inhibitory effect on the virus in infectivity tests *in vitro*. On the other hand there are several cases, described in literature, in which proteins of higher molecular weight (20 000-60 000 daltons) were isolated out of virus diseased plants. Those proteins usually exerted an unspecific inhibition effect on different viruses. There is no unequivocal evidence to what extent all those new proteins actively participate in the induction of antiviral resistance in the plant *in vivo*. They are similar in many respects to interferon proteins from animal tissues but also bear some essential differences.

Recently still other, specific proteins of high molecular weight (above 100 000 daltons) were detected in tobacco cells infected by TMV during first stages of viral multiplication. There is some evidence indicating that those might represent different forms of viral replicases.