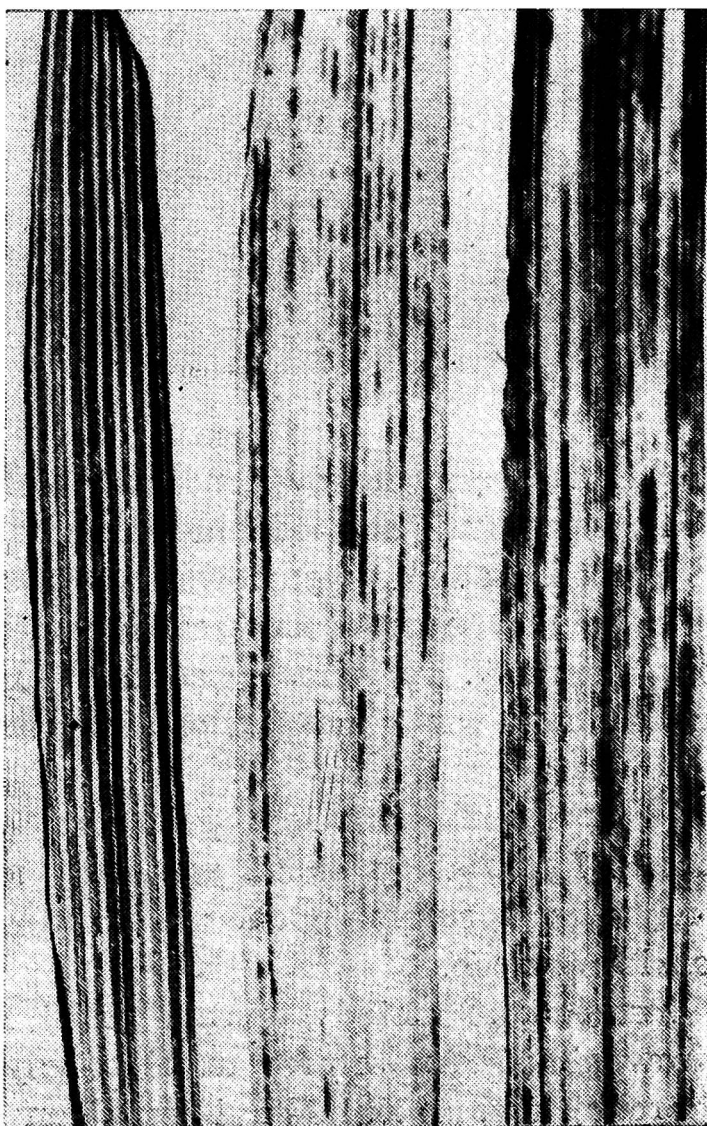


Z BADAŃ BIOCHEMICZNYCH NAD PSZENICĄ PORAŻONĄ PRZEZ WIRUS MOZAIKI PSZENICY OZIMEJ

Wojciech Kaniewski, Lidia Dunajska, Wanda Hoppe

Pracownia Wirusologii, Instytut Ochrony Roślin, Poznań

Wirus mozaiki pszenicy ozimej (*Triticum virus 8* Zažurilo et Sitnikova) został stwierdzony po raz pierwszy w Polsce w 1969 r. [5]. Był on dotychczas znany tylko na terenie Związku Radzieckiego [13, 14]. Wekto-rem wirusa jest skoczek zgłobik smużkowy — *Psammotettix alienus*.



Rys. 1. Liście pszenicy odmiana Małgorzatka Udycka z objawami porażenia przez wirus mozaiki pszenicy ozimej

Okres inkubacji wirusa w ciele owadów wynosi przeciętnie 21-23 dni, a wirozy w roślinach pszenicy 15-17 dni. Zainfekowane rośliny pszenicy charakteryzują się przejaśnieniem nerwów liści, mozaikowatością liści (rys. 1), żółknięciem, zahamowaniem wzrostu (rys. 2), częściową lub całkowitą płonnością kłosów (rys. 3) [6, 7]. Oprócz zbóż, wirus poraża dość



Rys. 2. Rośliny pszenicy odmiana Żelazna; z lewej zdrowa, z prawej porażona przez wirus mozaiki pszenicy ozimej (fot. K. Szubert)

znaczną liczbę gatunków i odmian roślin z rodziny traw, a objawy chorobowe kształtują się podobnie jak u pszenicy.

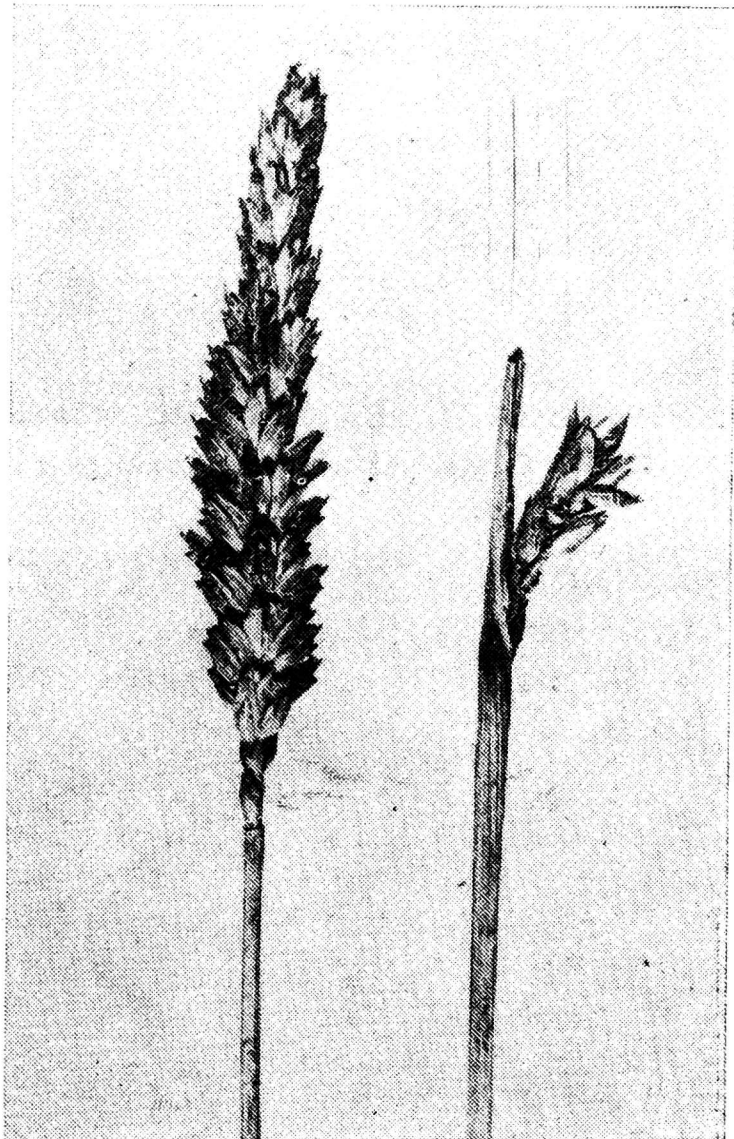
Po przebadaniu występowania wirusa i jego właściwości biologicznych przystąpiono do prób oczyszczania wirusa i badań biochemicznych porażonej pszenicy. Dotychczas badania typu biochemicznego nad pszenicą porażoną przez wirus mozaiki pszenicy ozimej prowadził jedynie Atabiekov [1].

Przeprowadzono wiele prób oczyszczenia wirusa mozaiki pszenicy ozimej. Materiał do badań stanowiły młode liście pszenicy ozimej porażonej tym wirusem, pochodzące zarówno z doświadczeń polowych, jak i szklarniowych.

Przebadano metody opisane przez Maata [10], wykorzystujące ultrawiwowanie różnicowe przy użyciu różnych buforów i stosowaniu wstępnej ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi. Następnie oczyszczano zawiru-

sowaną pszenicę metodą Suchova [12], wykorzystującą strącanie w punkcie izoelektrycznym. Metodami tymi nie uzyskano preparatów, w których wirus byłby widoczny pod mikroskopem elektronowym.

Zastosowana metoda ultrawierwienia różnicowego z użyciem detergentu doprowadziła do uzyskania preparatu, w którym pod mikroskopem

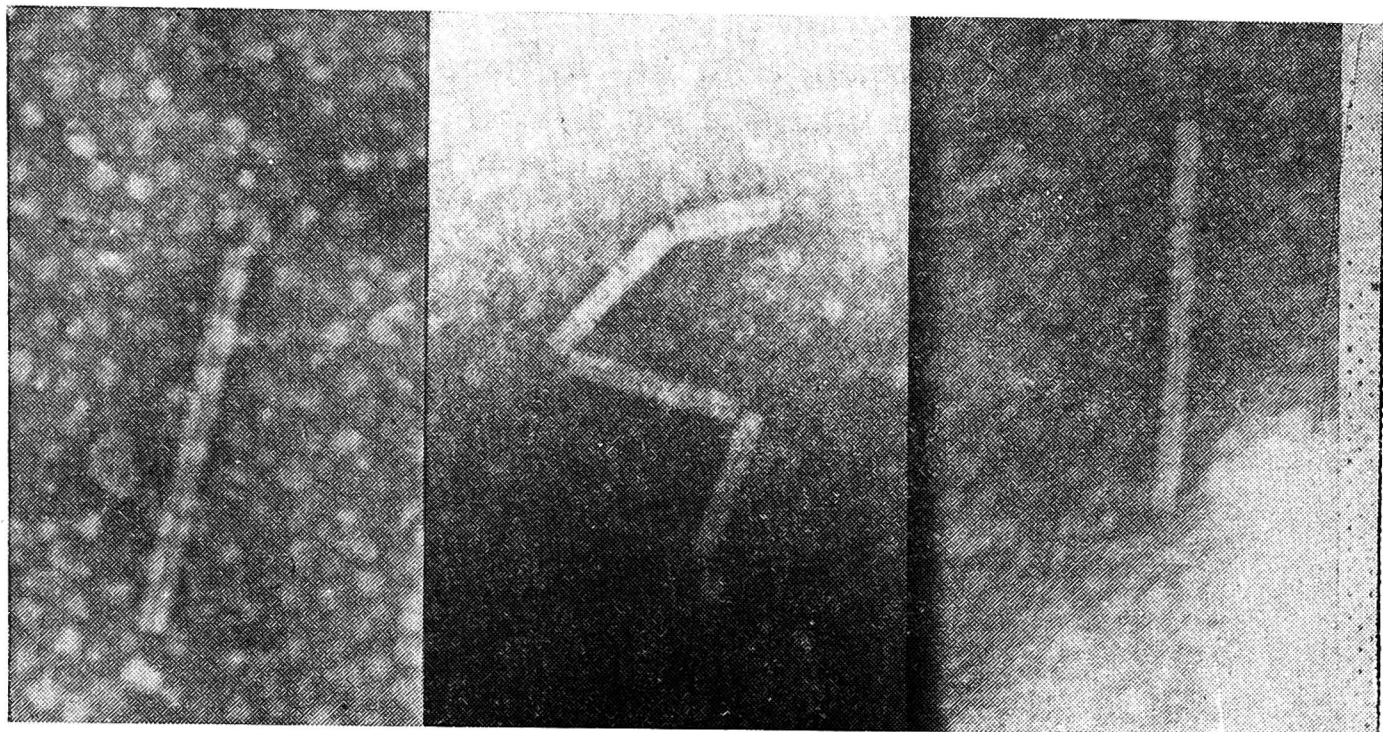


Rys. 3. Kłosa pszenicy odmiana Żelazna; z lewej kłos rośliny zdrowej, z prawej kłos rośliny chorej

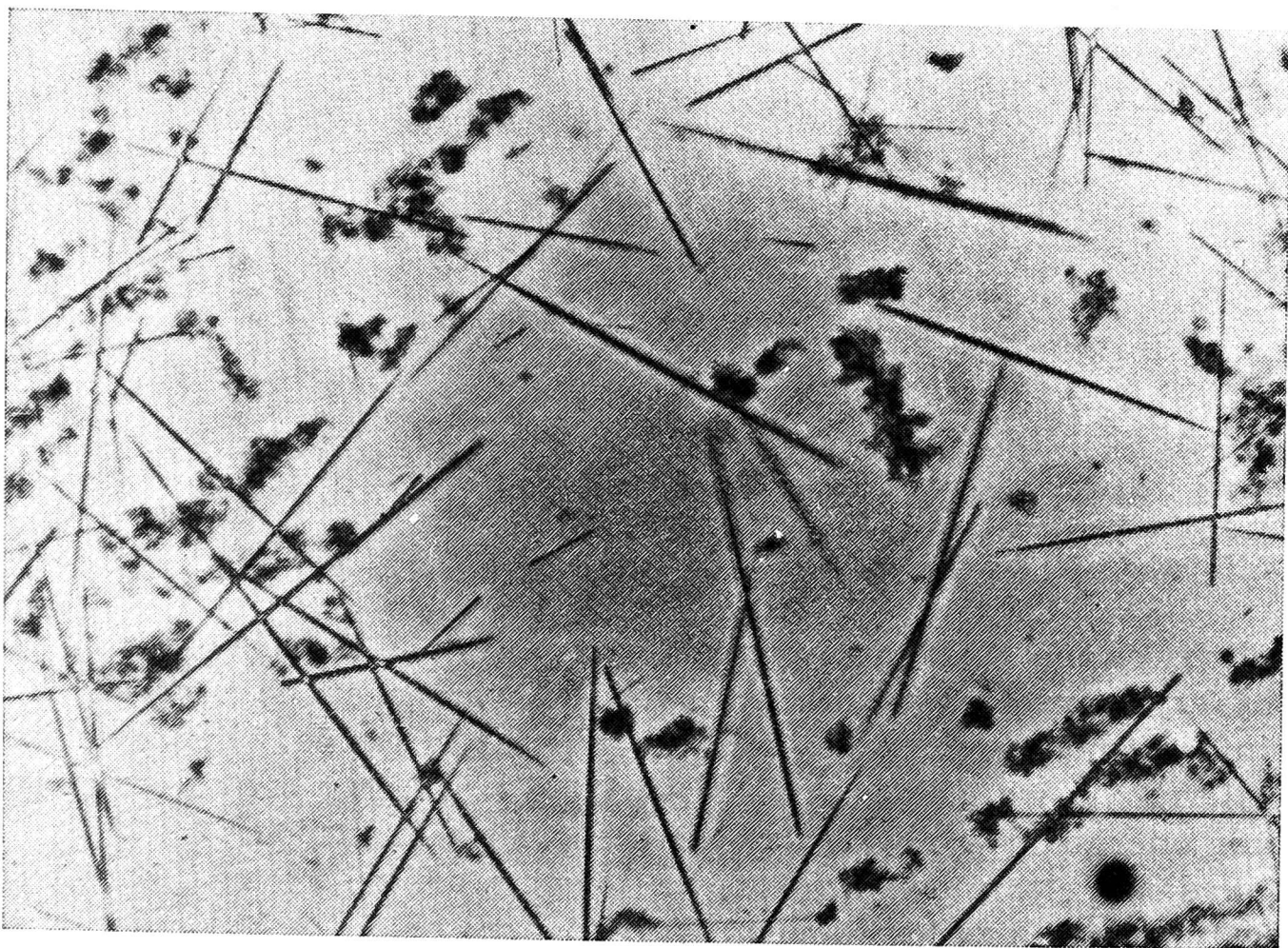
zaobserwowano pojedyncze pałeczki wirusa (rys. 4). Podobne obrazy pojedynczych pałeczek wirusa obserwowano w preparatach uzyskanych z zainfekowanej pszenicy oczyszczonej poprzez strącanie w punkcie izoelektrycznym wg metody Atabiekova [1], a także przy bezpośrednim badaniu mikroskopowym pszenicy chorej metodą zanurzeniową.

Badania elektronomikroskopowe przeprowadzono metodą barwienia negatywowego z zastosowaniem 2% PTA przy pH 7 [2]. Stwierdzono, że średnica obserwowanych pałeczek wynosiła około 13 nm, a średnica wewnętrznego kanału 2-2,5 nm. Dane te są zgodne z wartościami podanymi przez Atabiekova dla cząsteczek białka wirusa mozaiki pszenicy ozimej.

Średnia długość pałeczek wynosiła około 230 nm. Nigdy nie stwierdzono pałeczek wirusa w identycznie oczyszczonych próbach kontrolnych pszenicy zdrowej. Próby uzyskania czystego preparatu wirusa w ilościach



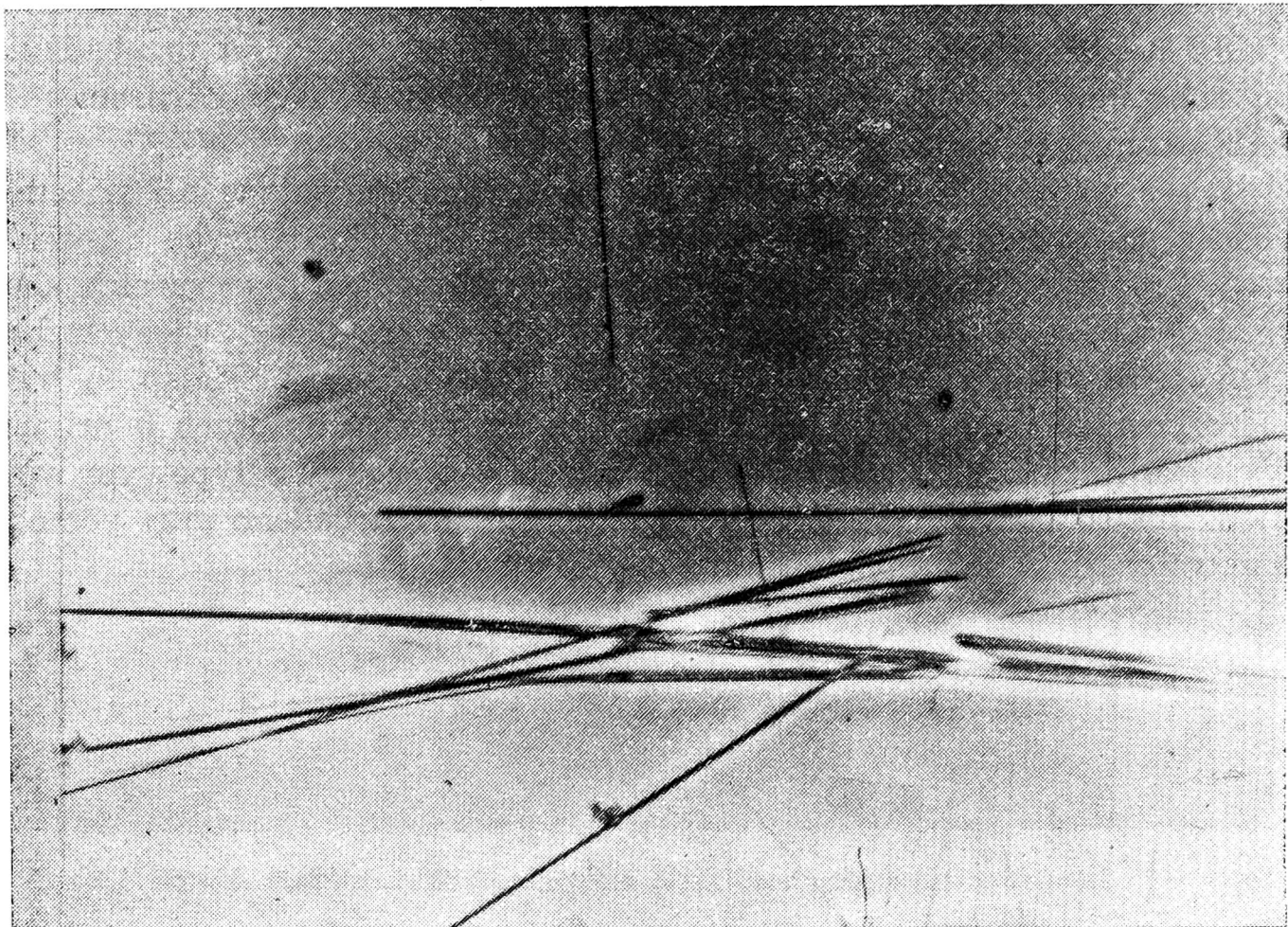
Rys. 4. Cząsteczki wirusa mozaiki pszenicy ozimej (powiększenie 180 000×)



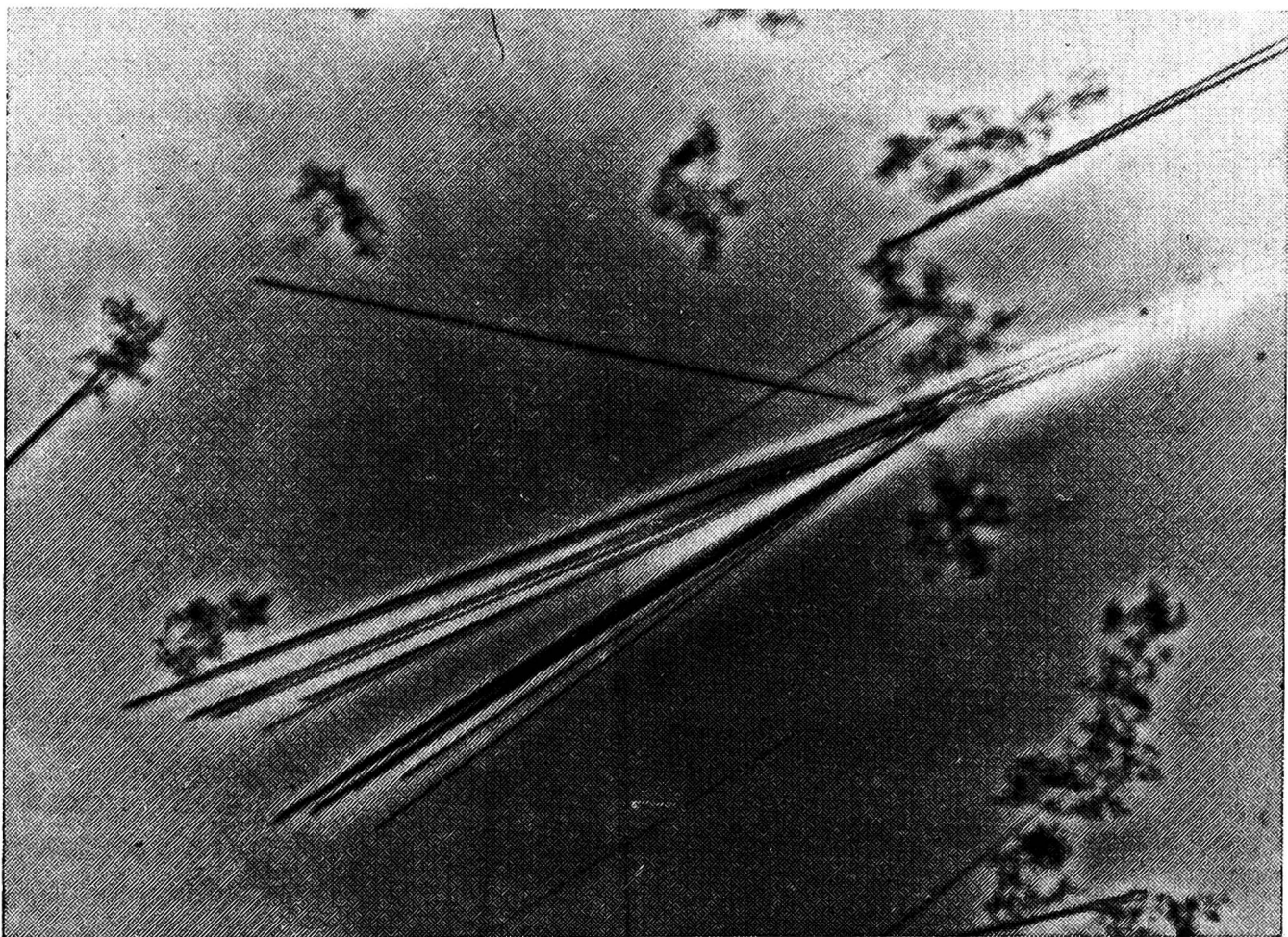
Rys. 5. Igiełki kryształów białka wirusowego (krótkie) — powiększenie 250×

umożliwiających przeprowadzenie jakichkolwiek badań poza elektronomikroskopią nie powiodły się.

Przez zakwaszenie do pH 4,8 ekstraktu uzyskanego z pszenicy chorej otrzymywano każdorazowo duże ilości osadu. Pod mikroskopem świetlnym stwierdzono, że osad stanowią kryształy w kształcie igiełek (rys. 5,



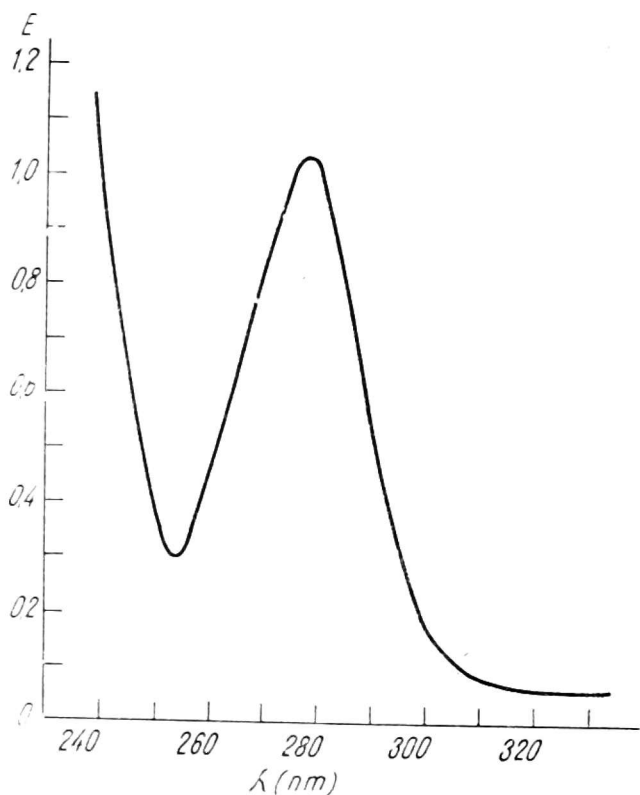
Rys. 6. Igielki kryształów białka wirusowego (długie) — powiększenie 250×



Rys. 7. Wiązka kryształów białka wirusowego (powiększenie 250×

6, 7). Kryształków takich nigdy nie uzyskano przy identycznym traktowaniu pszenicy zdrowej. Dalszą uwagę skoncentrowano na przebadaniu tej substancji znajdującej tylko w roślinach porażonych wirusem mozaiki pszenicy ozimej.

Przez wielokrotne powtarzanie strącania poprzez zmianę pH połączonego z wirowaniem [1] uzyskano preparat służący do dalszych doświadczeń. Preparat okazał się białkiem charakterystycznym dla pszenicy chorej i obecnym w niej w bardzo dużych ilościach (ze 100 g świeżych liści pszenicy uzyskiwano zwykle ponad 10 mg tego białka). Białko to było nierozpuszczalne w wodzie i dobrze rozpuszczalne w buforach o pH powyżej 5. Kształt jego widma w ultrafiolecie był zgodny z typowym widmem innych białek (rys. 8). Jednorodność preparatu badano przy pomocy elektroforezy w żelu poliakrylamidowym [9]:

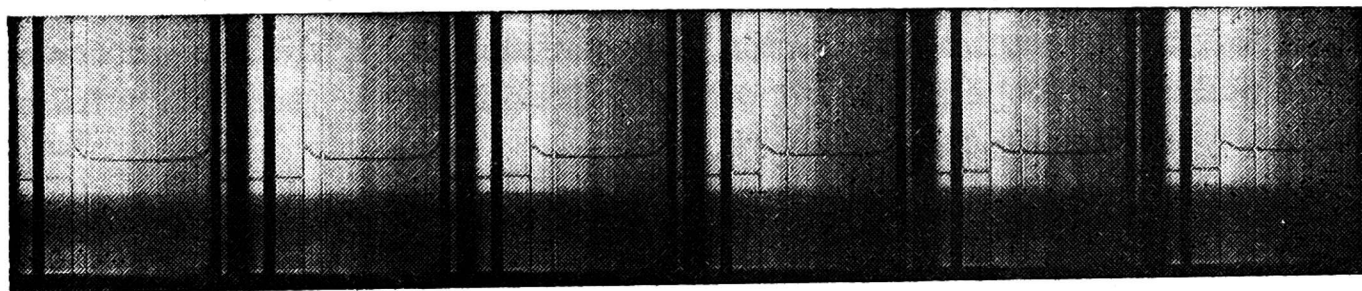


Rys. 8. Widmo w ultrafiolecie białka wyizolowanego z pszenicy chorej

Po zastosowaniu akrylamidu o stężeniu 7⁰/₀ stwierdzono obecność jednej dominującej wąskiej strefy i jednej nikłej, migrującej szybciej. W tym samym celu wirowano badane białko w gradiencie sacharozy z dodatkiem akrylamidu w skali mikro. Na gradient sacharozy o różnicy stężeń 5⁰/₀-25⁰/₀ nanoszono 10 μ l 1⁰/₀ roztworu białka i wirowano przez 2,5 godz. przy 36 000 obr/min (100 000 g). Po spolimeryzowaniu i wybarwieniu stwierdzono obecność jednej strefy białkowej w okolicy początku żelu.

Wykonano oznaczenie współczynnika sedymentacji białka na ultrawirówce analitycznej firmy Beckman model E. [3] Wirowano 1⁰/₀ roztworu białka w 0,1 M buforze fosforanowo-sodowym o pH 7,5. Zastosowano prędkość wirowania 56 000 obr/min i temperaturę 20°C. Zdjęcia wykonano przy kącie schlieren 70°C w odstępach 2 minutowych. W wyniku uży-

skano serię zdjęć (rys. 9) obrazujących przesuwanie się bardzo ostrej granicy między rozpuszczalnikiem a roztworem i prawie nierozmywającej się w trakcie wirowania. Małe wzniesienie krzywej $\frac{dn}{dr} = f(r)$ w okolicy linii menisku sugeruje obecność niewielkiej ilości drugiego składnika o niższym ciężarze cząsteczkowym, obserwowanego także w wyniku elektroforetycznego rozdziału białek. Współczynnik sedymentacji głównego komponentu, obliczony metodą graficznego całkowania $(S_{20}^{\circ}, b)_c$ wyniósł 13,6 S. Ostrość granicy między rozpuszczalnikiem a roztworem sugeruje liniową budowę badanego białka, czyli wysoką wartość stosunku długości do średnicy cząsteczki [11].



Rys. 9. Analiza sedymentacyjna białka (zdjęcia z ultrawirówki)

Przeprowadzono ilościową analizę aminokwasów białka. Białko zhydrolizowano 6 N kwasem solnym w zatopionej fiolce, ogrzewając do temperatury 105°C przez 24 godziny. Kwas solny usunięto przez kilkakrotne odparowanie do sucha na wyparce próżniowej w temperaturze do 60°C.

Aminokwasy rozpuszczano w buforze cytrynianowym o pH 2,2 i wykonano ich analizę ilościową na automatycznym analizatorze aminokwasów Multichrom firmy Beckman. Zawartość tryptofanu w białku oznaczono spektrofotometrycznie [4]. Skład aminokwasowy badanego białka przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Skład aminokwasowy specyficznego białka pszenicy porażonej wirusem mozaiki pszenicy ozimej

Aminokwas	Procent wagowy aminokwasu w białku	Aminokwas	Procent wagowy aminokwasu w białku
Kwas asparaginowy	14,64	Metionina	2,55
Treonina	7,55	Izoleucyna	6,78
Seryna	11,80	Leucyna	10,07
Kwas glutaminowy	16,66	Tyrozyna	3,85
Prolina	3,49	Fenyloalanina	4,69
Glicyna	0,87	Histydyna	0,00
Alanina	1,78	Lizyna	7,09
Cystyna	0,00	Arginina	2,85
Walina	3,99	Tryptofan	1,34

WNIOSKI

1. Wirus mozaiki pszenicy ozimej obecny jest w porażonej roślinie w bardzo małej koncentracji, co uniemożliwiło uzyskanie go w skali preparatywnej.
2. Stosując strącenie w punkcie izoelektrycznym izoluje się z porażonej pszenicy duże ilości niskocząsteczkowego białka, którego nie ma w roślinie zdrowej.
3. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń nie można udowodnić czy wyizolowane białko jest produktem rozpadu wirusa, czy też powstaje w roślinie porażonej w wyniku zmiany metabolizmu rośliny pod wpływem wirusa.
4. Pomimo dużej zgodności wyników naszych doświadczeń z danymi Atabiekova nie jesteśmy w stanie jednocześnie stwierdzić czy obserwowane pod mikroskopem elektronowym pałeczki są cząsteczkami wirusa, czy też tylko jego otoczką białkową.

LITERATURA

1. Atabiekov J. G., Popowa G. A., Kisielev N. A., Kaftanowa A. S.: *In vitro* polymerization of winter wheat mosaic virus antygen. *Virology*, 1968, 35, s. 448-472
2. Brandes J., Paul H. L.: Das elektronenmikroskop als Hilfsmittel bei der Diagnose pflanzlicher Viroser. *Betrachtungen zur Vermessung faden- und stäbchenförmiger Virusteilchen*. *Arch. Mikrobiol.*, 1957, t. 26, s. 358-368
3. Elias H. G.: *Ultrazentrifugen — Methoden*. Beckman Instruments GmbH, München, 1969
4. Goodwin W., Morton R. A.: The spectrophotometric determination of tyrosine and tryptophan in protein. *Biochem. J.*, 1946, 40, s. 628-632
5. Hoppe W.: Badania nad wirozą pszenicy i żyta powodującą paskowaną mozaikę na liściach. *Biul. IOR*, 1969, 44, s. 101-108
6. Hoppe W.: Dalsze obserwacje nad występowaniem wirozy pszenicy o objawach paskowanej mozaiki i wyniki niektórych badań nad jej przenoszeniem. *Zesz. probl. Post. Nauk rol.*, 1972, 133, s. 143-144
7. Hoppe W.: Badania nad wirozą pszenicy wywołaną przez wirus mozaiki pszenicy ozimej. *Prace nauk. Inst. Ochr. Rośl.*, 1974, t. 16, z. 2, s. 105-180
8. Jolley W. B., Allen H. W., Griffith O. M.: Ultracentrifugation using acrylamide gel. *Anal. Biochem.*, 1967, 21, s. 454
9. Kaniewski W.: Technika elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w zastosowaniu do rozdziału białek. *Hod. Rośl. Nas.*, 1971, z. 1, s. 21
10. Maat D. Z.: *Purification of plant viruses*. Inst. Phytopath, Res., Wageningen 1965
11. Schachman H. K.: *Ultracentrifugation in Biochemistry*. Acad. Press., New York 1968
12. Suchov K. S.: Purification of crystal preparation of winter wheat mosaic virus. *Dokl. Akad. Nauk USSR*, 1943, 39, s. 72
13. Zažurilo V. K., Sitnikowa G. M.: Mozaika ozimój pszenicy. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 1939, 25, 9, s. 796-799
14. Zažurilo V. K., Sitnikowa G. M.: Vzaimootnosenije mezdu virusom mozaiki ozimój pszenicy i jeg perenosnikom — polosatoj cikadkoj (*Deltocephalus striatus* L.). *Dokl. Akad. Nauk Zasc. Rast.*, 1941, 11, s. 27-29

Войцех Каневски, Лидия Дунайска, Ванда Гоппе

ИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПШЕНИЦЕ ПОРАЖЕННОЙ ВИРУСОМ МОЗАИКИ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Резюме

В работе представлены результаты опытов по очистке вируса мозаики озимой пшеницы. Применены методы очистки по Маату, Сухову, Атабекову и детергентный метод. В больной пшенице установлено под электронным микроскопом небольшие количества палочек вируса размером 230×13 нм.

В больной пшенице установлено наличие больших количеств специфического белка и изолировано путем осаждения в изоэлектрической точке. Этот белок был нерастворим в воде и хорошо растворим в буферах с pH выше 5. Форма спектра в ультрафиолете согласовалась с типовым спектром других белков. Однородность белка установлена с помощью электрофореза в полиакриламидном желе и путем аналитического центрифигирования в градиенте сахара.

Коэффициент седиментации белка составлял 13,6 S. В работе представлен аминокислотный состав исследуемого белка.

Wojciech Kaniewski, Lidia Dunajska, Wanda Hoppe

SOME BIOCHEMICAL STUDIES ON WHEAT INFECTED WITH WINTER WHEAT MOSAIC VIRUS

Summary

Results of experiments are reported concerning purification of wheat virus. The method of purification of Maat, Suchov, Atabekov and the detergent method were applied. In diseased wheat small numbers of virus rods of dimensions 230×13 nm were found in the electron microscope.

Infected wheat contained large amounts of specific protein which was isolated by precipitation at the isoelectric point. This protein was insoluble in water but readily soluble in buffers with pH above 5. The ultraviolet spectrum conformed with the typical one for other proteins. The homogeneity of the protein was established by electrophoresis with polyacrylamide gel and by analytical centrifugation in a sucrose gradient.

The protein sedimentation coefficient was 13,6 S. The amino acid composition of the isolated protein is given.