

**К.С. Коробкова¹, А.М. Онищенко¹, Л.П. Панченко¹, О.Є. Мамчур²,
О.О. Дмитрук², В.І. Редько³**

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН, вул. Шевченко, 97, Чернігів, Україна

³Інститут цукрових буряків УААН, вул. Клінічна, 25, Київ, Україна

СТВОРЕННЯ МОДЕЛЬНОЇ СИСТЕМИ *IN VITRO* ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ФІТОПАТОГЕННИХ МОЛІКУТІВ З КЛІТИНАМИ РОСЛИН

*Створено модельну систему на основі інфікування калюсних тканин цукрового буряку мікоплазмами, а також вивчено зміни морфології клітин калюсів під впливом цих мікроорганізмів. Калюси цукрового буряку ЗК51, культивовані на середовищі Гамборга, заражали молікутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulit* шт. 118. Під впливом молікутної інфекції відбувалися зміни морфології клітин калюсу цукрового буряку: перетворення форми з округлої до надмірно витягнутої, підвищення інтенсивності утворення поліплоїдних форм клітин, розташування їх групами, а також повна деструкція. Дані електронної мікроскопії підтвердили наявність молікута у калюсах цукрових буряків: клітини ахолеплазм розташовувалися як у міжклітинниках, так і всередині недиференційованих клітин.*

Ключові слова: молікути, взаємодія, калюси, ультраструктура клітини, модельна система.

В сучасних умовах культура клітин є зручним інструментом у вирішенні багатьох проблем молекулярної біології. При вивченні фітопатологічних процесів цінність методів біотехнології полягає у тому, що взаємовідносини між клітиною хазяїна і паразитом відтворюються у контрольованих умовах живлення, температури тощо. В результаті досліджень вченими було висловлено думку, що за певних умов взаємодія партнерів у культурі відображає їх взаємовідносини у природі [3, 7, 11, 12].

Метод культивування клітин в умовах *in vitro* використовують для вивчення фізіології і біохімії хворої рослини, патологічних процесів, що відбуваються в рослині під впливом бактерій, грибів, вірусів [11, 12]. Цей метод надає широкі можливості для вивчення молекулярних і клітинних механізмів імунітету рослин, таких як первинні етапи впізнання, трансдукції сигналу, індукції і експресії захисних реакцій, а також інших питань, які неможливо розкрити на тканинах цілої рослини. Проте потенціал біотехнологічного методу для вивчення взаємовідносин рослин і фітопатогенних молікутів (мікоплазм) використовується не повною мірою. Раніше були описані спроби культивування представників молікутів у калюсних культурах різних рослин, здебільшого вони виявлялися невдалими [3, 10, 13]. У деяких публікаціях подано результати досліджень відносно введення мікоплазм у калюсні культури. Так, у роботі Petru зі співавторами було отримано калюси тютюну (*Nicotiana glauca* Grah), заражені збудником відьминих мітел картоплі. У калюсах, вирощених на середовищі з кінетином та індолілоцтовою кислотою (ІОК), клітини мікоплазм зберігалась і навіть розповсюджувалась у новоутвореній тканині. У цьому випадку більшість рослин-регенерантів було уражено мікоплазмозами [14, 15].

© Ю.О. Павлова, С.О. Гнатуш, С.П. Гудзь, 2009

Ми вважаємо, що система сумісного культивування патогена і клітин рослини-мішені *in vitro* може стати зручною моделлю при вивченні особливостей фітопатогенезу хвороб мікоплазмової етіології. Створення модельної системи на основі фітопатогенних молікүтів і недиференційованих клітин (калюсів) рослин надасть можливість вивчити молекулярні механізми взаємодії цих мікроорганізмів із клітиною-хазяїном, а також дослідити особливості сигнальних відповідей на біотичний стрес. Тому метою нашої роботи було розробити модельну систему на основі інфікування калюсних тканин цукрового буряку мікоплазмами, а також дослідити зміни морфології клітин калюсів під впливом цих мікроорганізмів.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували калюси цукрового буряку ЗК51, культивовані на середовищі Гамборга. Молікүт *Acholeplasma laidlawii var. granulum* шт. 118 (отриманий із Національної колекції мікроорганізмів України і зберігається у відділі мікоплазмології Інституту мікробіології і вірусології НАН України), який спричиняє блідо-зелену карликовість пшениці, культивували на штучному середовищі СМ ІМВ-72 [8]. Інокуляцію калюсів культурою ахолеплазми проводили за допомогою стерильних шприців на 7, 14, 21, 28, 35 добу після пересаджування.

Для вивчення змін морфології клітин калюсу цукрового буряку під впливом молікүтної інфекції було використано метод давлених препаратів [6]. Для світової мікроскопії застосовували мікроскоп Ломо (Санкт-Петербург, Росія), при збільшенні від $\times 400$.

Зміни ультраструктури калюсних тканин цукрового буряку під впливом молікүтної інфекції, а також контроль наявності ахолеплазм в інфікованому матеріалі проводили за допомогою електронної мікроскопії. Для цього використовували такі методики приготування препаратів:

1. Зразки калюсної тканини відбирали на 10 добу після зараження. Фіксацію проводили у 2,5 %-ому розчині глутаральдегіду в фосфатному буфері, рН 7,2, протягом 12 год при температурі 4°C. Відмивку проводили у цьому ж буфері, потім фіксували в 1,5 %-ому розчині OsO_4 протягом 12 год, після чого знову відмивали. Зневоднення виконували у зростаючих концентраціях етилового спирту (від 30 до 100°) та при двох змінах абсолютного ацетону, після чого проводили просочування матеріалу смолами. Зразки заливали епон-аралдітовою сумішшю, капсули полімеризували протягом доби при температурі 60°C;

2. В іншому варіанті калюсний матеріал фіксували у 6,5 %-ому розчині глутаральдегіду в фосфатному буфері, рН 7,0, протягом ночі, потім відмивали у цьому ж буфері. Постфіксацію проводили у 15 %-ому KMnO_4 протягом 2 год. Зневоднення, просочування виконували як описано вище, матеріал заливали в аралдіт [9].

Ультратонкі зрізи виготовляли за допомогою ультрамікротому Bs 490А, забарвлювали розчином цитрату свинцю та ураніл ацетатом [9], зразки аналізували з використанням електронних мікроскопів Tesla-540 і EM-125 при збільшенні 7-10 тис.

Результати та їх обговорення. Встановлено, що найбільш активне зараження калюсних культур цукрового буряку фітопатогенними ахолеплазмами відбувається при їх інфікуванні на 21 добу після пасажу рослинної культури, після чого відсоток ураження зменшується. Згідно з спостереженнями калюси, інфіковані молікүтами, росли більш інтенсивно, до того ж клітини їх були значно більшими порівняно із контрольними. Це узгоджується з даними Петру з співавторами, які досліджували калюси, одержані з інфікованих мікоплазмами рослин картоплі та тютюну [14, 15].

Труднощі методу світової мікроскопії для вивчення калюсних тканин були обумовлені рядом специфічних особливостей матеріалу, зокрема, наявністю великих міжклітинників, надмірною вакуолізацією тощо. Встановлено, що під впливом інфекції фітопатогенними ахолеплазмами клітини калюсів змінюють свою форму з округлої до надмірно витягнутої, підвищується інтенсивність утворення поліплоїдних форм, розташованих групами, які зустрічаються у полі зору з більшою частотою порівняно з неінфікованими варіантами (рис. 1). Така реакція калюсних клітин у культурі *in vitro* є проявом мутагенного впливу молікүтів на генетичний апарат клітин рослини, що в природі призводить до утворення типових симптомів мікоплазмозів на рослинах у вигляді потворних форм – «відьминих мітел», карликовості тощо [1].

Поряд із щільними зонами поліплоїдизації також спостерігаються зони повної деструкції, які утворюються внаслідок масової загибелі клітин (лишаються самі пусті оболонки), що призводить до збільшення нерівномірності структури уражених калюсів (рис. 1). Вірогідно, це є проявом відповіді рослинної клітини на стресову ситуацію у вигляді реакції надчутливості.

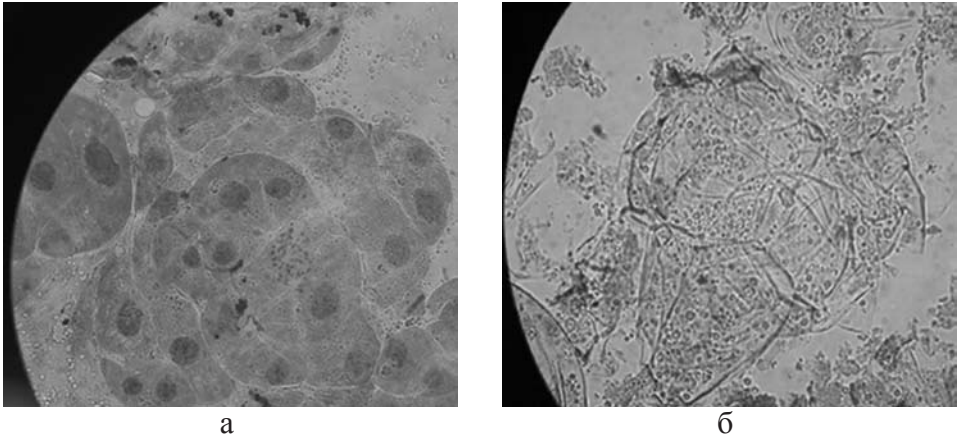


Рис. 1 Світлова мікроскопія калюсів цукрового буряку ЗК51
(а – неінфікованих, б – інфікованих *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118 : x 1000)

Електронномікроскопічне вивчення ультраструктури клітин калюсів дало можливість деталізувати дані світлової мікроскопії. Встановлено, що зі збільшенням віку інфікованих калюсних клітин спостерігається більш інтенсивне утворення розривів між клітинами. Внаслідок ослаблення міжклітинних зв'язків у інфікованих клітин порушуються «перетяжки», які, зазвичай, існують між пухкорозташованими клітинами неушкоджених калюсів. Оболонка клітин набуває зморшкватості, збільшується кількість звивин, що особливо чітко спостерігається з подовженням терміну після інфікування (рис. 2). Деформація клітинної стінки рослин, пов'язана з інвагінаціями всередину клітини, може свідчити про penetрацію ахолеплазм.

Одержані нами дані електронної мікроскопії підтвердили наявність молікута у калюсах цукрових буряків: клітини ахолеплазм розташовувалися як у міжклітинниках, так і зустрічалися всередині клітин. У деяких випадках спостерігався процес поділу ахолеплазм, що відбувався як шляхом сегментації нитковидних форм, так і бінарним поділом – як рівновеликим, так і нерівномірним. Ці результати підтверджують припущення про можливість активної життєдіяльності клітин фітопатогенних молікутів, виділених із пшениці, у незвичайних для них умовах – калюсних тканинах цукрового буряку. У природі часто спостерігається зараження цієї сільськогосподарської культури мікоплазмами, яке супроводжує вірусну інфекцію [4, 5].

Слід зауважити, що крім клітин *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 з морфологією, характерною для цих мікроорганізмів при культивуванні на штучних живильних середовищах,

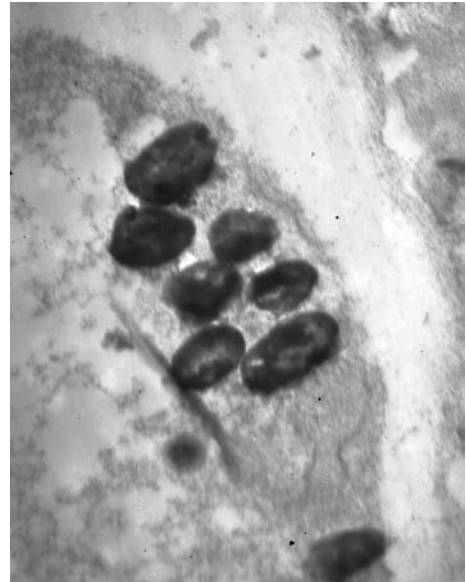


Рис. 2. Електронограма ультратонкого зрізу клітин калюсу цукрового буряку ЗК51, інфікованих *A. laidlawii* var. *granulum* шт.118 (: x 45000)

у калюсних клітинах переважно спостерігалися численні електронно-прозорі везикули зменшеного розміру, які мали характерну товсту граничну мембрану (рис. 3). Згідно з даними літератури, утворення таких форм молікутів обумовлено механізмами трансформації (нанотрансформації) цих мікроорганізмів із перетворенням їх у «міні-тіла» – ультрамікроформи (наноформи), і є характерним для фітопатогенних молікутів у природних умовах. Вважають, що утворення наноформ є реакцією цих мікроорганізмів на несприятливі зовнішні умови. Поряд із «звичайними» формами вони проявляють більш високу стійкість до стресової дії і зберігають потенційну здатність до проліферації, а також реверсії. Існують відомості, що трансформація молікутів пов'язана із суттєвою реорганізацією експресії генів, що може зумовити зміни метаболізму, і, відповідно, патогенності цих мікроорганізмів [1, 2, 16].

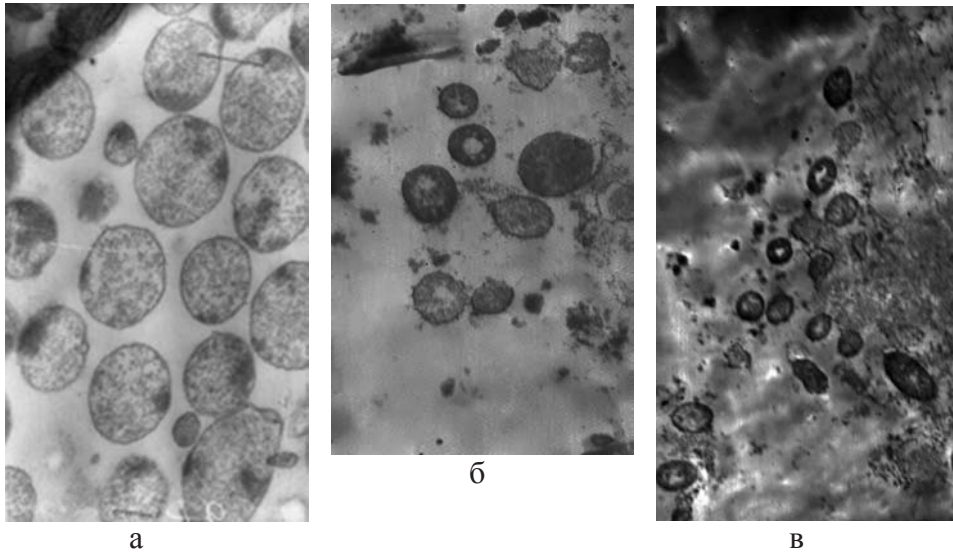


Рис. 3. Електроннограма ультратонких зрізів клітин *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118 (а – в поживному середовищі СМ ІМВ-72 : х 65000; б – типові клітини у калюсах цукрового буряку ЗК51 : х 50000 ; в – наноформи молікута у калюсах цукрового буряку ЗК51 : х 50000)

Отже, виконані дослідження підтвердили, що в умовах *in vitro* можливе зараження клітин калюсу цукрових буряків фітопатогенним штамом молікутів *A. laidlawii* var. *granulum* шт. 118. Одержану подвійну культуру передбачається використовувати як модельну систему при вивченні особливостей взаємодії клітин рослин із молікутами, а також застосовувати як зручний інструмент при відборі засобів з антимолікутною дією на першому етапі контактування цих організмів.

Е.С. Коробкова¹, А.Н. Онищенко¹, Л.П. Панченко¹, А.Е. Мамчур²,
О.А. Дмитрук², В.И. Редько³

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев,

²Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, Чернигов,

³Институт сахарной свеклы УААН, Киев

СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ МОЛЛИКУТОВ С КЛЕТКАМИ РАСТЕНИЙ

Резюме

Создана модельная система, основанная на инфицировании каллусных тканей сахарной свеклы микоплазмами, а также изучены изменения морфологии клеток каллусов под воздействием данных микроорганизмов. Каллусы сахарной свеклы ЗК51, культивированные на среде Гамборга, заражали молликутом *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* шт. 118. Под воздействием молликутной инфекции происходили изменения морфологии клеток каллуса сахарной свеклы: изменения формы от округлой до чрезмерно вытянутой, повышение интенсивности образования полиплоидных форм клеток, расположенных группами, а также полная их деструкция. Данные электронной микроскопии подтвердили наличие молликутов в каллусах сахарной свеклы: клетки ахолеплазм располагались как в межклетниках, так и наблюдались внутри недифференцированных клеток.

Ключевые слова: молликуты, взаимодействие, каллусы, ультраструктура клетки, модельная система

K.S. Korobkova¹, A.M. Onyshchenko¹, L.P. Panchenko¹, O.E. Mamchur²,
O.O. Dmytruk², V.I. Redko³

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Institute of Agricultural Microbiology, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Chernigiv

³Institute of Sugar Beet Research, Ukrainian Academy of Agrarian Sciences, Kyiv

ELABORATION OF THE *IN VITRO* MODEL SYSTEM TO STUDY THE INTERACTION OF PHYTOPATHOGENIC MOLLICUTES WITH PLANT CELLS

Summary

The model system based on the sugar beet calluses infected by mycoplasmas (mollicutes) was elaborated, and changes in the callus cells morphology under the effect of these microorganisms were also studied. The calluses of sugar beet ЗК51 cultivated on the Gamborg medium were infected by phytopathogenic mollicute *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* str. 118. Under the effect of mollicute infection one could observe changes in the cell morphology of sugar beet calluses: the plant cells were transformed from round to lengthened, the intensity of polyploids forming was increased, their grouping and their total destruction were observed. Data of electron microscopy confirm the presence of the mollicute in the sugar beet calluses: acholeplasma cells were localized between and within undifferentiated plant cells.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: mollicutes, interaction, calluses, cell ultrastructure, model system.

The author's address: K.S. Korobkova, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Борхсенцус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. — СПб.: Наука, 2002. — 319 с.
2. Гоголев Ю.В. Морфофизиологические и генетические особенности взаимодействия *Acholeplasma laidlawii* с растениями *Pisum sativum* // Автореф. дис. канд. биол. наук. — 1997. — 23 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. — Киев: Наук. думка, 1980. — 487 с.
4. Колесник Л.В. Смешанная инфекция вирусов, микоплазмо- и риккетсиеподобных организмов в растениях с симптомами желтухи и мозаики // «Фитонциды. Бактериальные болезни растений» (Ужгород, октябрь 1985): Тез. докл. — Киев: Наук. думка, 1985. — С. 140—141.
5. Колесник Л.В., Порембская Н.Б., Бобырь А.Д. Ультраструктура клеток листьев сахарной свеклы при смешанной вирусной инфекции // Микробиол. журн. — 1984. — 46, № 3. — С. 68—71.
6. Кунах В.А., Левенко Б.А. Модификация метода давлений препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. — 1975. — IX, № 1. — С. 56—58.
7. Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимоотношения патогена и растения-хозяина // Биологические науки. — 1990. — № 2. — С. 6—21.
8. Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм // Микробиол. журн. — 1984. — 46, № 2. — С. 71—75.
9. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих: Пер. с англ. / Под ред. В.Ю. Полякова. — М.: Мир, 1975. — 314 с.

10. Федотина В.Л., Крылова Н.В. Освобождение табаков от микоплазменной инфекции столбура методом культуры ткани // Докл. АН СССР. — 1976. — **228**, № 4. — С. 1005—1008.
11. Daub M.E. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens // Ann. Rev. Phytopathol. — 1986. — **24**. — P. 159—186.
12. Earle E. D., Graws V.E. The role of protoplasts and cell cultures in plant disease research. // Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility. — New York, 1981. — P. 285—297.
13. Parmessur Y., Aljanabi S., Sauntally S., Dookun-Sauntally A. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture // Plant Pathology. — 2002. — **51**, N 5. — P. 561—573.
14. Petru E., Limberk J., Ulrychova M., Break J. Growth and infectivity of callus cultures of tomato plants infected with a mycoplasma disease — potato witches broom // Biol. plant. — 1971. — **13**, N 5/6. — P. 391—395.
15. Petru E., Ulrychova M. Persistence and spread of mycoplasma in axenic callus tissue cultures of tobacco (*Nicotiana glauca* Qrah.) in the presence of kinetin and IAA in nutrient medium // Biol. plant. — 1975. — **17**, N 5. — P. 352—356.
16. Seto S., Mijata M. Cell reproduction and morphological changes in *Mycoplasma capricolum* // J. Bacteriol. — 1998. — **180**. — P.256—264.

Отримано 17.09.2008

УДК 578.233

О.І. Гордейчик, І.С. Щербатенко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

ПОШУК ПОДІБНИХ НУКЛЕОТИДНИХ САЙТІВ У ГЕНОМНИХ СИКВЕНСАХ ФІТОПАТОГЕННИХ ВІРУСІВ

Проведено комп'ютерний пошук подібних нуклеотидних сайтів у геномах фітопатогенних вірусів шляхом послідовного співставлення двох геномних сиквенсів зі зростаючою величиною зсуву їх початкових позицій.

Встановлено граничні параметри не випадкової збіжності нуклеотидів у сиквенсах, показано наявність подібних нуклеотидних сайтів у філогенетично далеких родів вірусів, уточнено систематичне положення вірусу некрозу лізіантусу, виявлено особливості локалізації подібних нуклеотидних сайтів у вірусних геномах.

Ключові слова: віруси рослин, геномні сиквенси, подібні сайти, збіжність нуклеотидів, спорідненість вірусів, комп'ютерний аналіз

Подібність сиквенсів вірусних геномів чи їх окремих сайтів зазвичай виражають у відсотках збіжних нуклеотидів (percentage of nucleotide sequence identity) і використовують для аналізу філогенетичної і структурно-функціональної спорідненості вірусів [1, 9, 13, 14, 15]. Для визначення відсотку збіжних нуклеотидів найчастіше застосовуються численні алгоритми і комп'ютерні програми вирівнювання сиквенсів [2, 3, 6, 7, 10, 16], однак, не зважаючи на їх постійне вдосконалення, труднощі комп'ютерного аналізу спорідненості геномів все ще залишаються суттєвими [11, 12, 17]. Одним із шляхів вирішення цієї проблеми є розробка нових методів аналізу подібності сиквенсів, альтернативних вирівнюванню [4, 18].

Багатократне співставлення сиквенсів замість вирівнювання використано в нашій роботі. Метою роботи було виявлення подібних нуклеотидних сайтів у геномах фітопатогенних вірусів шляхом послідовного співставлення пар сиквенсів зі зростаючою величиною зсуву їх початкових позицій.

Матеріали і методи. У роботі використано випадкові нуклеотидні послідовності і геномні сиквенси 189-ти (+)олРНК-вмісних фітопатогенних вірусів, що відносяться до 5-ти родин і 18-ти родів: Flexiviridae (Alexi-, Capillo-, Carla-, Fovea-, Potex-, Tricho-, Vitivirus); Tombusviridae (Avena-, Aureus-, Carmo-, Necro-, Tombusvirus); Luteoviridae (Luteo-, Polorovirus); Tymoviridae (Tymovirus); Potyviridae (Potyvirus); Tobamovirus, Sobemovirus.

Геномні сиквенси отримували з банків даних за програмою Entrez. Випадкові послідовності довжиною 6400 нуклеотидів генерували за датчиком випадкових чисел у межах 1—4, використовуючи функція $\text{int}(\text{RND} * 4 + 1)$ і «прив'язуючи» кожний із 4-х нуклеотидів до конкретного числа (наприклад, 1-А, 2-Г, 3-С, 4-Т).

© О.І. Гордейчик, І.С. Щербатенко, 2009