

ВІРУСІНФІКОВАНИЙ КАЛЮС КВАСОЛІ ТА ЙОГО ОЗДОРОВЛЕННЯ *IN VITRO* ЗА ДІЇ ЛІПОСОМАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

О.Г. Коваленко, А.М. Кириченко, О.Ю. Коваленко

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,
вул. Акад. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна
e-mail: udajko@ukr.net

Метою даної роботи є розробка системи оздоровлення квасолі, ураженої вірусами жовтої (ВЖМК) та звичайної мозаїки квасолі (ВЗМК) за комбінування культури калюсу і ліпосомальних препаратів гліканів. **Методи.** Культивування експлантів і калюсних культур здійснювали в умовах *in vitro* за загальноприйнятими методами біотехнології рослин. Введення експлантів в культуру *in vitro* проводили у весняно-літній період. Наявність вірусної інфекції встановлювали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. Для ідентифікації вірусів використовували вірус-специфічні праймери, які дозволяли ампліфікувати консервативні ділянки гена капсидного білка ВЖМК або ВЗМК. **Результати.** В результаті виконання роботи отримана та адаптована до випробування антивірусних засобів культура калюсу квасолі, інфікованої вірусом звичайної мозаїки квасолі. Показано, що в процесі тривалого культивування (10–12 тижнів) в присутності ліпосомального препарату, що містив глюкан *Ganoderma adspersum* (10–100 мг/л) відбувається елімінація вірусу з клітин, про що свідчить відсутність в калюсній тканині послідовності розміром 391 н.п., характерної для гена білка оболонки вірусу. **Висновки.** В калюсній тканині, отриманій з ВЗМК-інфікованої квасолі, культивованій на середовищі В-5 у присутності ліпосомального глікан-гліколіпідного комплексу (10–100 мг/л) відбувається повне пригнічення репродукції та поступова елімінація вірусу. Отримані дані можуть слугувати передумовою для розробки технології оздоровлення рослин від вірусних інфекцій з використанням калюсної культури та антивірусно-активних глікан-гліколіпідних комплексів на ліпосомальній основі.

Ключові слова: калюсна культура, ліпосоми, вірус жовтої мозаїки квасолі, вірус звичайної мозаїки квасолі.

Вірусні хвороби рослин мають широке розповсюдження і спричиняють значні втрати продукції рослинництва – основної галузі сільськогосподарства. На квасолі найбільш поширеними у світі є віруси звичайної (ВЗМК) [3, 4] та жовтої мозаїки квасолі (ВЖМК) [5], які призводять до великих (30–40 %), а подекуди і до повної втрати продукції цієї важливої продовольчої культури [6].

Нашими дослідженнями встановлено, що серед основних збудників хвороб квасолі ВЗМК та ВЖМК є економічно важливими і в Україні, позаяк ці віруси в окремих її регіонах за останні роки набули досить широкого розмаху [7, 8]. Характерною особливістю цих вірусів є те, що вони, на відміну від багатьох інших, можуть передаватись від покоління до покоління через насіння, що створює велику загрозу репродукції та врожайності квасолі. Відтак необхідність запобігання вірусних хвороб та обмеження їхньої шкодочинності на цій культурі є цілком очевид-

ними та економічно доцільними.

Один із заходів з оздоровлення рослин від вірусних захворювань базується на культурі рослинної тканини *in vitro* [9]. При цьому оздоровлення рослинних клітин від вірусів відбувається інтенсивніше, коли процес культивування тканин *in vitro* поєднується із застосуванням хіміотерапії. Як оздоровчий засіб в культурі рослинних тканин найбільшу популярність набув рибавірин (віразол) і його похідні [10]. Використання рибавірину в комбінації з оселтамівіром забезпечувало 100 %-не оздоровлення рослин винограду від *Grapevine fleck virus* [11]. Недоліком рибавірину є його висока фітотоксичність щодо рослинної тканини, що заважає отриманню високого виходу оздоровлених рослин.

Метою даної роботи є розробка та адаптація культури калюсу (КК) квасолі до випробування противірусних препаратів на ліпосомальній основі для оздоровлення рослин, уражених ВЗМК і ВЖМК.

Матеріали і методи

Культура калюсу (КК). Джерелом для отримання калюсних клітин були рослини квасолі *Phaseolus vulgaris* L. сорту «Червона шапочка». Рослини культивували у вегетаційному будиночку у весняно-літній період та залучали в роботу у віці 4–8 тижнів. За вірусний інокулюм для рослин правили очищені методом диференціального центрифугування препарати (10 мкг/мл) ВЗМК та ВЖМК у 0,01 М фосфатному буфері (рН 7,2). Для отримання калюсних тканин було відібрано рослини квасолі з характерними симптомами вірусного ураження жовтої (ВЖМК) та звичайної (ВЗМК) мозаїки листової пластинки.

Культивування експлантів і калюсних культур здійснювали в умовах *in vitro* за загальноприйнятими методами біотехнології рослин [1, 2]. Для отримання калюсу було відібрано фрагменти листових пластинок та міжвузля стебел інфікованих ВЖМК або ВЗМК рослин. Ізольовані листки та міжвузля переносили в стерильні чашки Петрі, встелені фільтрувальним папером та за допомогою коркобура (діаметром 1 см) або скальпеля вирізали з них фрагменти (площею ~ 0,5–1 см²). Отримані експланти стерилізували в 3% NaOCl (або в 70 %-ному розчині Domestos) впродовж 3–5 хв, після чого тричі відмивали стерильною дистильованою водою (по 10 хв) та висаджували в трьох повторностях на агаризоване стерильне середовище Гамборга і Евелега (середовище В5) з додаванням кінетину та 2,4-Д у концентраціях 0,1 та 1 г/л відповідно. За необхідності реакцію середовища доводили до значення рН 5,5. Стерилізацію поживного середовища проводили термічно водяною парою під тиском 0,5 МПа при температурі 121° С впродовж 1 год. Експланти до утворення калюсу культивували в термостаті за температури 24–25° С впродовж двох тижнів, після чого колби з культурами переносили до люмінестату з освітленням люмінесцентними лампами силою 5 000 лк та 16-годинним фотоперіодом. Впродовж 1–3 місяців спостерігали за розвитком культур та перевіряли на наявність продуктів синтезу вірусу методом ПЛР [12].

Ліпосомальні препарати гліканів. В роботі нами використано два ліпосомальні глікан-гліколіпідні комплекси (ГГК-3 та ГГК-4), сформовані на основі водорозчинного глюкану *Ganoderma adspersum* (ГГК-3) та суми гліканів (манан *Candida maltosa*, глюкан *G. adspersum*, глюкуронооксиломанан *Tremela mesenterica*) (ГГК-4). Методи отримання гліканів та їхніх лі-

посомальних форм описані нами у попередніх роботах [13, 14]. Препарати в досліджах використовували в концентрації 10–500 мг/л у вигляді емульсій, доданих до агаризованого середовища В5 (рН 5,5). Середовища з препаратами стерилізували у тому ж режимі, що і контрольні (без препаратів), як указано вище.

Виявлення вірусу в листі і калюсі. Тестування інфікованих ВЗМК зразків листя та калюсу квасолі на наявність послідовностей вірусної РНК, специфічних до білка оболонки (БО) вірусу, проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). В роботі використовували праймери, що дозволяють ідентифікувати фрагмент РНК, що кодує ген БО ВЗМК з такими нуклеотидними послідовностями: 5'-ttcggacgtcgtgagtgtta-3' (прямий праймер) та 5'-cccgagtgccacattaattcc-3' (зворотний праймер); розмір продукту ампліфікації становив 391 п.н. [12]. Синтез праймерів на наше замовлення виконано «Біолабтех» (Київ, Україна).

Сумарну РНК виділяли з використанням комерційного набору «РИБО-Сорб» («AmpliSens», Росія). Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору «Реверта-L-100» («AmpliSens», Росія) згідно з протоколом виробника. Для проведення ПЛР використовували реакційну суміш (15 мкл), що містила: 1х ПЛР буфер з 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (дНТФ), 1 пМ кожного (прямого і зворотного) з олігонуклеотидних праймерів, 10–40 нг кДНК, 0,5U Taq-полімерази. Реакцію ампліфікації проводили в ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01 («НПО ДНК-Технологія», Росія).

Результати досліджень. Для отримання вірус-інфікованої КК квасолі використовували інфіковані ВЖМК або ВЗМК рослини квасолі із симптомами яскраво вираженої жовтої або звичайної мозаїки листової пластинки (рис. 1). Диски і фрагменти тканини, ізольовані з листя рослин квасолі та оброблені, як указано вище, було висаджено на середовище В5 та культивовано впродовж двох тижнів в термостаті за температури 24–25° С. Вже через 14 діб після висаджування експлантів відмічали утворення калюсу, що мав м'яку консистенцію. Згодом новоутворена тканина набувала жовто-рожевого кольору, а за культивування впродовж 10–12 тижнів некротизувалась та зморщувалась, а іноді і відмирала (рис. 2).

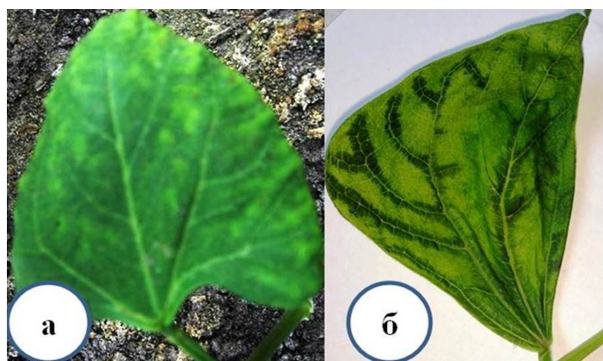


Рис. 1. Листя квасолі, ураженої ВЖМК (а) та ВЗМК (б), що слугувало для отримання культур калюсних клітин

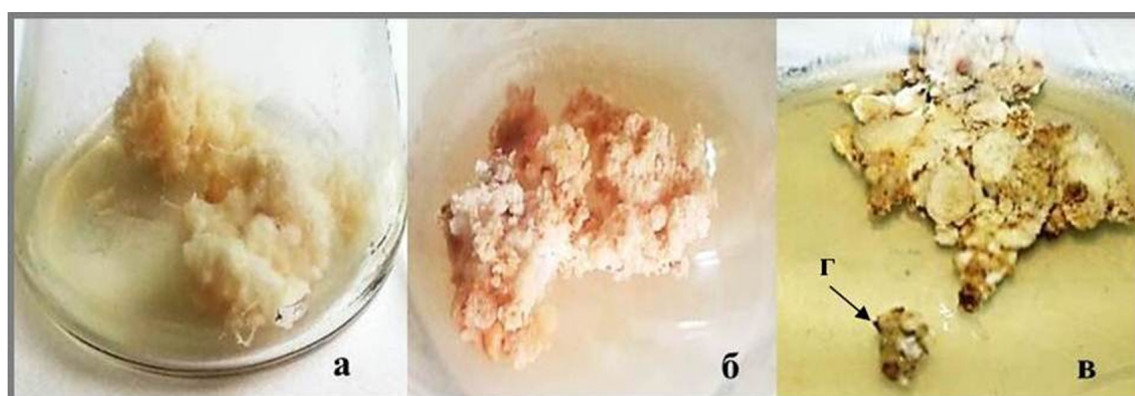


Рис. 2. Культура ВЖМК-інфікованого калюсу квасолі: а – молода культура; б, в – старіюча культура; г – відмерлий експлант

Відмічені ознаки КК квасолі, ураженої ВЖМК, а також невисока інтенсивність росту калюсної тканини, ймовірно, обумовлені високою патогенністю цього вірусу щодо рослини-хазяїна. Ці характеристики системи КК-ВЖМК не сприяли виконанню головного завдання даної роботи, а саме: випробування антивірусних препаратів як оздоровчих засобів, позаяк, не давали можливості оцінити їхню можливу цитотоксичність на фоні швидкого спонтанного старіння культури та відмирання клітин калюсу. Тому в подальшій роботі для отримання вірус-інфікованого калюсу нами було використано систему ВЗМК-квасоля, в якій вірус, за нашими спостереженнями [4], проявляв, на відміну від попереднього, меншу патогенність щодо рослини-хазяїна. До того ж цей вірус передавався через насіння з більшою частотою. Ця обставина уможливила отримання інфікованого калюсу не лише з паренхіми листків, але й насінневих зародків, що дозволяло досліджувати також перебіг насінневої інфекції. Це, в свою чергу, відкривало і реальну перспективу оздоровлення насіннєвого потомства рослин, уражених цим вірусом.

Для отримання вірус-інфікованої КК нами було відібрано уражені ВЗМК рослини квасолі з характерними симптомами хвороби: деформацією, пухирчастістю, скручуванням листової пластинки та темно-зеленою пігментацією тканини, що локалізувалась переважно вздовж листових жилок. (див. рис. 1, б). З рослин із симптомами вірусного ураження та з відповідних ділянок листя здорових рослин (контроль) нами було відібрано зразки тканини і методом ПЛР перевірено їх на наявність продуктів вірусного синтезу. Дослідження показали присутність продуктів синтезу РНК ВЗМК у зразках тканини з інфікованих рослин. Про це свідчила наявність продуктів ампліфікації розміром 391 п.н. і відсутність їх в контролі. Результати електрофорезу продуктів вірусного геному показано на рис. 3.

Калюсоутворення, індуковане на міжвузлях та фрагментах листових пластинок, висаджених на середовище В5 спостерігали вже через тиждень після повисадки експлантів. Калюс, що утворювався як із фрагментів листків, так і з міжвузел квасолі наростав досить інтенсивно, мав щільну структуру, світ-

ло-жовте забарвлення (рис. 4). При пасажуванні культур, яке проводилось щомісяця, консистенція і забарвлення калюсу не змі-

нювалось. Зовні він виглядав однаково – як із здорових рослин, так і з рослин, уражених ВЗМК.

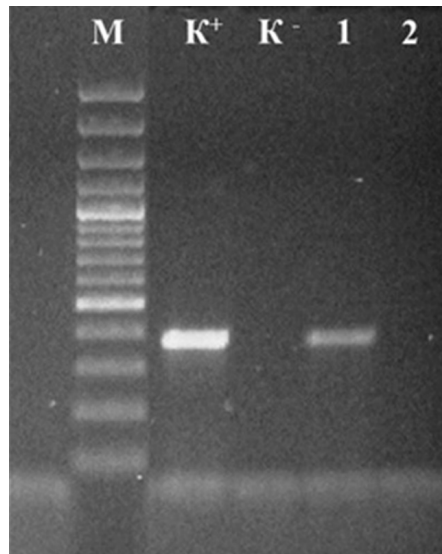


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР листя квасолі, інфікованої ВЗМК; М – маркер молекулярної маси нуклеотидів (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM1203), 1 – листя квасолі, уражені ВЗМК; 2 – листя здорових рослин квасолі; К⁺, К⁻ – позитивний та негативний контролю

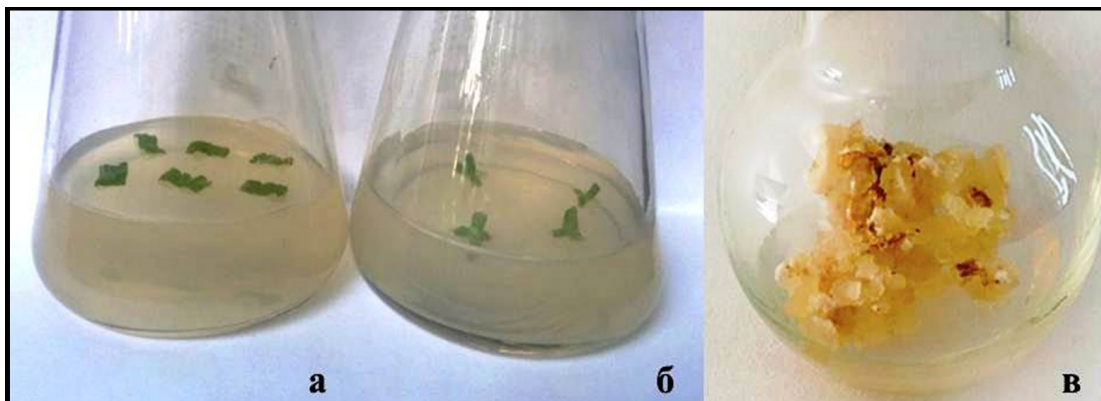


Рис. 4. Формування калюсу з рослин квасолі, ураженої ВЗМК; експланти з листя (а) та міжвузля (б); в – калюс 30-добового віку

Слід також зазначити, що більш придатними для отримання КК були експланти, отримані з міжвузля та ділянок листка вздовж центральної жилки.

Антивірусна дія ліпосомальних препаратів. Для випробування дії ліпосомальних ГГК на репродукцію ВЗМК в КК квасолі *in vitro* нами спершу було визначено їхнє відношення щодо калюсних тканин. Дослідами було встановлено, що ГГК-3 та ГГК-4 за концентрації їх у поживному середовищі, рівному 500 мг/л, а останній і нижчій концентрації (50–100 мг/л)

мали токсичну дію щодо калюсу. Відтак у подальших дослідях випробовували лише ГГК-3 в концентрації 100 та 10 мг/л. В результаті подальших дослідів було встановлено, що ГГК-3 не проявляв вираженої шкідливої дії щодо калюсної тканини *in vitro* за вмісту його в середовищі 10–100 мг/л у порівнянні з контролем.

Здатність ГГК-3 впливати на репродукцію ВЗМК у культурі *in vitro* було виявлено за допомогою ПЛР-аналізу зразків калюсу, отриманого з експлантів квасолі, інфікованих ВЗМК та ви-

рошених на поживному середовищі з додавання ГГК-3 та без нього (рис. 5).

Було встановлено наявність продуктів синтезу ВЗМК у контрольних зразках калюсу, отриманих на поживному середовищі В5 без додавання ГГК-3, та у вихідному листку квасолі, інфікованому цим вірусом, про що свідчить наявність продукту ампліфікації нуклеотидної послідовності 391 п.н. – фрагмента гена, що кодує синтез БО вірусу. У зразках калюсу, отриманих на середовищі з додаванням ГГК-3 відповідних продуктів вірусної РНК виявити не вдалося.

Таким чином, наші дані переконливо показують, що в калюсній тканині, отриманій з ВЗМК-

інфікованої квасолі та культивованій впродовж 10 тижнів на середовищі В-5 у присутності ліпосомального глікан-гліколіпідного комплексу (10–100 мг/л), відбувається повне пригнічення репродукції та поступова елімінація вірусу. Ці дані можуть слугувати певною передумовою для розробки технології оздоровлення рослин від вірусних інфекцій з використанням КК та антивірусно-активних ГГК на ліпосомальній основі. Необхідні подальші дослідження, які могли б обґрунтувати доцільність широкого використання подібних засобів оздоровлення, регенерації та мікроклонального розмноження трав'янистих, плодових рослин та винограду *in vitro*.

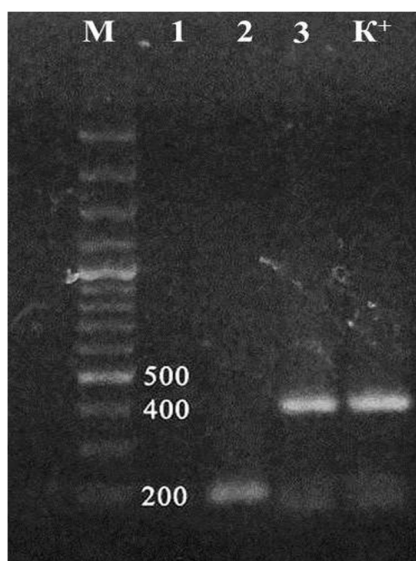


Рис. 5. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР аналізу продуктів синтезу ВЗМК в зразках калюсу, отриманого на середовищі з ГГК-3: 1 – 0,1 мг/мл, 2 – 0,01 мг/мл; 3 – без додавання ГГК, К⁺ – позитивний контроль (вихідний листок), М – маркер молекулярної маси нуклеотидів (O'GeneRuler™ DNA Ladder, #SM1203)

Обговорення результатів. Нашими дослідженнями вперше, наскільки нам відомо, пропонується експериментальна система вірус-інфікованих калюсних клітин квасолі для випробування і оцінки антивірусних засобів на ліпосомальній основі. В якості основного чинника нами пропонується використовувати глікани вищих грибів і дріжджів. Поряд з вираженими противірусними властивостями [13], останні виявились ефективними також щодо пухлини, індукованих у паренхімі бульб картоплі Ті-плазмідною фітопатогенної бактерії *Agrobacterium tumefaciens* [15]. Однак оздоровлення рослинних тканин *in vitro* біологічно активними гліканами значною мірою лімітується тим, що активні інгредієнти препаратів являють

собою високомолекулярні біополімери, а відтак не можуть поглинатися рослинними тканинами. Тому для підвищення ефективності оздоровчих засобів у нашій лабораторії було розроблено ліпосомальні форми гліканів і їхня антивірусна та індукувальна активність, випробувана на рослинах тютюну та сої [14]. Показано, що ліпосомальні препарати гліканів не лише захищають рослини сої від вірусних хвороб, але й активують ризобіальну мікрофлору рослин, що призводить до кращого забезпечення рослин азотом і, як результат – до підвищення урожайності даної культури.

Як модельні об'єкти в даній роботі нами використано віруси, що уражують квасоллю, зокрема ВЗМК та ВЖМК [7, 8]. За нашими спосте-

реженнями, останній є більш патогенним щодо рослин, але перший з більшою частотою передається насінням. Ця обставина уможливила з більшим успіхом отримувати вірус-інфікований калюс в системі з ВЗМК, аніж із ВЖМК, причому не лише з паренхіми листя, але й пагонів міжвузля. Нами були підібрані поживні середовища, отримані та адаптовані для випробування антивірусних засобів КК, і показана можливість елімінації вірусу з калюсу клітин в присутності невисоких (10–100 мкг/мл) ліпосомальних форм гліканів, доданих до поживного середовища.

Отже, вперше нами продемонстрована можливість оздоровлення рослинних тканин від вірусних патогенів методом КК із застосуванням ліпосомальних препаратів гліканів та на новій моделі підтверджена їхня висока ефективність як засобів боротьби з вірусними хворобами рослин. Автори мають надію, що подальша робота у цьому напрямку, зокрема регенерація рослин із вірус-інфікованого калюсу *in vitro* дозволить розробити нову технологію оздоровлення і захисту рослин від хвороб вірусної, грибної та бактеріальної етіології.

VIRUS INFECTED BEAN TISSUE CULTURE CELLS AND IT'S HEALING *IN VITRO* USING LIPOSOMAL FORM OF GLYCANES

O.Hr. Kovalenko, A.M. Kyrychenko, O.Yu. Kovalenko

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny Str., Kyiv, 03143, Ukraine

Summary

The aim of the study was to develop a recovery means for beans infected by *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) as well as *Bean common mosaic virus* (BCMV) using callus culture and liposomal glycan preparations. **Methods.** Cultivation of explants and callus cultures was carried out *in vitro* using conventional methods of plant biotechnology. The tissue culture propagation was performed during the spring or summer seasons. The presence of viral infection was tested by reverse transcription polymerase chain reaction. The virus-specific primers that allowed amplifying the conserved regions of the capsid protein gene of BCMV or BYMV were used for virus identification. **Results.**

The culture of bean callus infected with BCMV was obtained and adapted for antiviral agents testing. It has been shown that during long-term cultivation (10–12 weeks) in the presence of liposomal preparation containing *Ganoderma adspersum* glucan (10–100 mg/l), plant tissue culture become free from viruses following virus eradication. This is evidenced by the absence in the callus tissue of 391 bp sequences typical for the virus coat protein gene. **Conclusions.** The full suppression of virus reproduction and gradual elimination of virus occurred in callus tissue obtained from BCMV-infected beans and cultured on B-5 medium supplemented with liposomal glycan-glycolipid complex (10–100 mg/l). The data obtained can be useful for the development of practical control method to cure plant virus diseases using callus culture and antiviral-active glycan-glycolipid complexes.

Keywords: callus culture, liposome, *Bean yellow mosaic virus*, *Bean common mosaic virus*.

1. Butenko RG. [Isolated tissue culture and physiology of plants morphogenesis]. Moscow: Nauka; 1964. Russian.
2. Kalinin FL, Sarnatskaya VV, Polishchuk VE. [Tissue culture methods in physiology and biochemistry of plants.] Kyiv: Naukova Dumka; 1980. Russian.
3. Morales FJ, Bos L. Bean common mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 337, 6 pp. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biology. 1988.
4. Makkouk K, Pappu H, Kumari SG. Virus diseases of peas, beans, and faba bean in the Mediterranean region. *Adv Virus Res.* 2012; 84:367–402.
5. Hagedorn D, Inglis D. Handbook of Bean Diseases. University of Wisconsin, 1986; 25 p.
6. Hema M, Sreenivasulu P, Patil BL, Kumar PL, Reddy DVR. Tropical Food Legumes. *Adv Virus Res.* 2014; 90:431–505.
7. Kyrychenko AM, Antipov IO, Hrynychuk KV. [Phylogenetic analysis of Ukrainian BYMV isolates from soybeans and beans]. *Cytol Genet.* 2017; 51(3):173–178. Ukrainian.
8. Kyrychenko AN, Kovalenko AG. [Bean common mosaic in the Kiev region: etiology disease and pathogen identification.] *Microbial Z.* 2018; 80(4):96–107. Ukrainian.

9. Gambinoz G, Bondal J, Gribaudo I. Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *Eur J Plant Pathology*. 2006; 114:397–404.
10. Panattoni A, Luvisi A, Triolo E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Review. *Span J Agric Res*. 2013; 11:173–188.
11. Guta IC, Buciumeanu EC, Vizitiu DE. Elimination of Grapevine fleck virus by in vitro chemotherapy. *Not Bot Horti Agrobi*. 2014; 42(1):115–118.
12. Antipov I, Hrynychuk K, Duplyak O. [Development PCR systems for identification of mosaic virus ordinary beans (Bean common mosaic virus)]. *Scientific herald of NULES of Ukraine. Series: biology, biotechnology, ecology*. 2016; 234:40–46. Ukrainian.
13. Kovalenko OG, Wasser SP. Glycans of higher Basidiomycetes mushrooms with antiphytoviral properties: isolation, characterization and biological activity. *Fungi and their Applications in the series of Progress in Mycological Research*. In: Deshmukh SK, Mishra JK, Jalpa P, Tewari, Tamas Papp. CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC; 2016. p.161–200.
14. Kovalenko OG, Vasilev VM, Adamchuk-Chalanyi NI, Tytova V, Karpenko EV. [Artificial glycan-glycolipid complexes as antiviral means and effectors of microbial preparations on the base of rhizobia.] *Dopov Nac acad nauk Ukr*. 2017; 1:88–96. Ukrainian.
15. Kovalenko OG, Polishchuk ON, Isakova VO. [Antitumor activity of some complex preparations in the culture of potato cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens*.] *Cytology and Genetics*. 2009; 43(3):164–168. Ukrainian.
16. Kovalenko OG. [To strategy and tactics of development of improvement and protection means against plant virus pathogens.] *Book of Abstracts of XV-th Congress of Vynogradskyi Society of Microbiologists of Ukraine (Odessa, September 11–15)*. 2017:318. Ukrainian.

Отримано 26.02.2020