



УДК 578:578.824:578.32

© 2007

Л. Ф. Діденко, Л. Д. Варбанец, Т. Ю. Мандріка,  
О. Б. Серденко, О. С. Броварська, В. М. Васильєв,  
член-кореспондент НАН України М. Я. Співак

### Новий рабдовірус плямистості листя айру

*Spot sweetflag virus (SSV) corresponds by its morphology and structural components to the definition of rhabdovirus and belongs to the family of Rhabdoviridae. Virions of SSV have a bacillus-like form and a size of 110–130 × 45 nm. SSV contains structural proteins of 130, 78, 66, 43–39, 32–30, and 25 kDa. In the structure of the virion, the following fat acids are identified: palmitic (47%), linolic (4.2%), oleic (14.9%), stearic (3.94%) acids, cholesterol (23%), and carbohydrates: glucose (25.3%), galactose (18.3%), arabanose (16%), fucose (3.98%), rambnose (3.1%), and mannose (2.32%). In SSV, together with monosaccharides, aminosaccharides (glucosamine and galactosamine) are found. The content of galactosamine is greater than that of glucosamine by a factor of 1:7.2.*

Раніше нами в рослинах айру (*Acorus calamus*) вперше був виявлений бацилоподібний вірус, що викликає плямистість листя айру [1]. Відповідно до загальноприйнятої системи номенклатури вірусів рослин, в основу якої покладено симптомологічний прояв захворювання на основній рослині — господарі, виявлене нами захворювання айру, що викликається вірусом бацилоподібної форми, названо плямистістю айру, а вірус — вірусом плямистості айру (ВПА).

Як відомо, бацилоподібна форма є характерною для вірусів родини Rhabdoviridae [2]. Вони містять мінус геномну РНК [3], п'ять структурних білків [4], ліпіди [5] і вуглеводи [6]. Для підтвердження правильності віднесення виявленого вірусу до родини Rhabdoviridae необхідним, на наш погляд, було вивчення його компонентів — білків, ліпідів і вуглеводів, які є невід'ємними структурними компонентами рабдовірусів.

Для виконання поставлених цілей необхідно було виділити високоочищені препарати вірусу. Для накопичення вірусу використовували рослини махорки (*Nicotiana rustica*), які інокулювали механічним способом.

Симптоми захворювання, що викликаються даним вірусом, на *N. rustica* виявлялися у вигляді первинних некрозів і деформації верхівкового листя. Листя з яскраво вираженими симптомами захворювання використовували для виділення вірусу, застосовуючи ПЕГ 6000. Спектрофотометричний аналіз очищених вірусних препаратів показав, що спектр поглинання в ультрафіолетовому світлі мав характерний максимум при довжині хвилі 260 нм і дещо

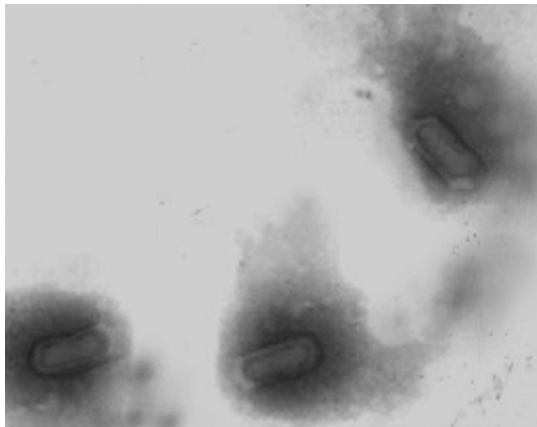


Рис. 1. Морфологія ВПА

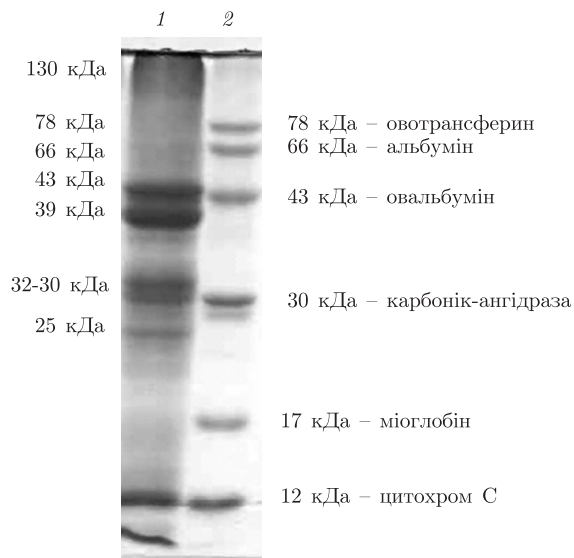


Рис. 2. Поліпептидний склад ВПА: 1 — поліпептиди ВПА; 2 — білки-маркери

згладжений мінімум при довжині хвилі 245 нм, що свідчить про наявність вуглеводів у вірусних препаратах. Відомо, що рабдовіруси містять вуглеводи, які в складі глікопротеїну формують на поверхні віріона пепломери [6].

Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що ізольовані вірусні частинки мали характерну для рабдовірусів бацилоподібну форму з розмірами 110–130 × 45 нм (рис. 1).

Електрофорезом в ПААГ встановлено, що структурні білки ВПА мають молекулярні маси 130, 78, 66, 43–39, 32–30, 25 кДа (рис. 2). Функціональні особливості кожного вірусного структурного поліпептиду ВПА поки ще не з'ясовані. Згідно з прийнятими позначеннями, білки класифікуються таким чином: G (65–90 кДа) — глікопротеїд, розташований на поверхні віріона; M1 (27–44 кДа) і M2 (22–25 кДа) — мембранні білки, які заповнюють простір між нуклеокапсидом і ліпідною оболонкою; N (47–62 кДа) — структурний білок, що формує чохол, в якому міститься геномна РНК; NS (40–50 кДа) і L (150–190 кДа) — нуклеокапсидні білки, що мають транскриптазну активність [7, 8].

Як відомо, макроструктура рабдовірусів визначається властивостями ліпідів, які формують подвійний шар, що оточує нуклеокапсид. Рабдовіруси рослин і тварин містять близько 20–35% ліпідів, які беруть участь у морфогенезі вірусів і в транспорті вірусних поліпептидів, захищаючи їх гідрофобні ділянки. Це впливає на інфекційність віріонів і реалізацію їх генетичної інформації в клітині господаря [5, 9]. Виходячи з цього, нами були проведені дослідження щодо аналізу ліпідів у складі фіторабдовірусу плямистості аїру.

У структурі досліджуваного вірусу виявлені та ідентифіковані ліпіди, якісний і кількісний склад жирних кислот яких наведено на рис. 3. Нейтральна ліпідна фракція ВПА у значній кількості представлена холестеролом (23%). Оскільки віруси не кодують синтезу власних ферментів біосинтезу ліпідів, їх склад залежить від природи клітинної мембрани господаря, від якої відбруньковуються віріони [5]. А як відомо, стерини (у тому числі і холестерол) містять мембрани як тваринних, так і рослинних клітин [10]. Холестерол свого часу був виявлений і у складі фіторабдовірусу жовтої сітчастості осоту, вірусу везикулярного стоматиту і вірусу сказу [11]. Домінуючою жирною кислотою ВПА є пальмітинова

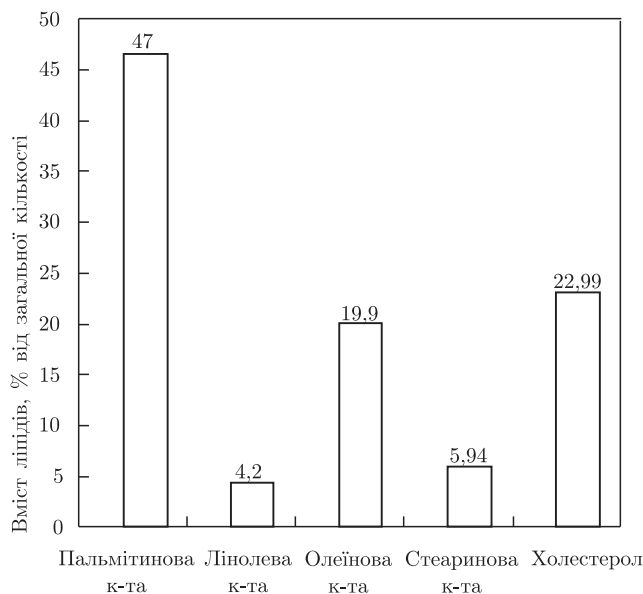


Рис. 3. Ліпідний склад ВПА

кислота (47%). У мінімальній кількості присутня лінолева кислота (4,2%). Вміст олеїнової кислоти становить 19,9%, стеаринової — 5,94%.

До складу рабдовірусів входять також і вуглеводи, які складають 3% від вірусної частинки. Вони представлені N-гліканами на глікопротеїні і гліколіпіді [7]. Поверхневі G білки рабдовірусів — глікопротеїни відіграють важливу роль на ранніх етапах взаємодії вірусу з клітиною, вони беруть участь як у транспорті та субклітинній локалізації синтезу вірусних макромолекул, так і в морфогенезі вірусних частинок. Властивості глікопротеїну значною мірою визначає його вуглеводний компонент, що бере участь в структурній організації рабдовірусів [6, 12]. Тому аналіз вуглеводів — одного із структурних компонентів рабдовірусів, становить значний інтерес, виходячи з його важливої функціональної ролі в експресії вірусного геному.

Аналіз моноцукридного складу показав, що у ВПА домінуючими є глюкоза (25,3%), галактоза (18,3%), арабіноза (16,0%). Значний вміст рибози (31,0%) вірогідно пояснюється наявністю нуклеїнової кислоти. У незначній кількості присутні рамноза і маноза 3,1 та 2,32% відповідно (рис. 4).

Поряд з нейтральними моноцукрами у складі ВПА виявлені також і аміноцукри — глюкозамін і галактозамін у співвідношенні 1 : 7,2.

Раніше у складі фіторабдовірусу кучерявої карликовості картоплі (ВККК) нами була виявлена глюкоза (35%) і маноза (23,8%) як домінуючі моноцукри, а також галактоза (12,3%), арабіноза (10,4%), рамноза (9,7%) та фукоза (8,6%) [13]. Аналогічні моноцукри — глюкоза, галактоза, маноза і аміноцукри — глюкозамін і галактозамін були ідентифіковані McSharry та Wagner у складі вірусу везикулярного стоматиту [14].

Оскільки у рабдовірусів поверхневий білок G глікозильований і має здатність аглютинувати еритроцити [7], то його карбогідратні залишки можуть, у свою чергу, розпізнаватися іншими лектинами, тим самим беручи участь у різних процесах біологічного пізнання. Це показано при лектинскрінінгу фіторабдовірусів вірусу жовтої карликовості картоплі і крапчастої карликовості баклажан [15]. Виходячи з цього, у результаті проведених досліджень

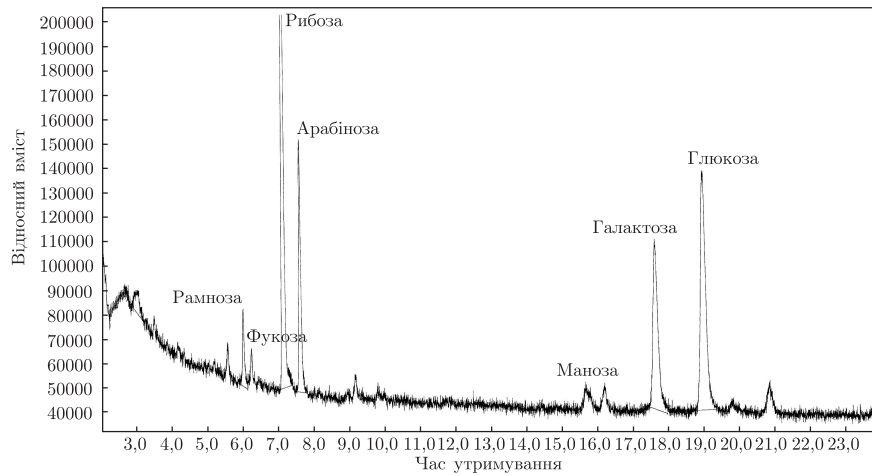


Рис. 4. Вуглеводний (моноцукридний) склад ВПА

встановлена гемаглютинуюча активність розчинної фракції структурних білків ВПА. Виявилось, що мінімальна кількість білка, яка здатна викликати аглютинацію еритроцитів, становила для ВПА 8,7 мкг/мл. Імовірно, таким структурним білком ВПА є оболонковий глікопротеїд G. Це визначає перспективу його можливого використання у сфері застосування лектинів.

Таким чином, вірус, що викликає плямистість аїру, за своєю морфологією і структурними компонентами відповідає визначенню рабдовирусу і належить до родини Rhabdoviridae. Об'єднує досліджуваний вірус з іншими представниками цієї родини і те, що він містить структурні білки, один з яких має гемаглютинуючу активність. Крім того, ВПА в своїй структурі містить вуглеводи і ліпіди, хімічна організація яких повністю визначається клітинними ферментами, що забезпечують синтез, перенесення і приєднання відповідних компонентів. Ідентифікація вуглеводів і ліпідів показала, що фіто- і зоопатогенні рабдовируси у ряді випадків містять деякі ідентичні моноцукри і жирні кислоти, що, можливо, відображає єдину еволюційну програму розвитку цих вірусів.

1. Мандріка Т. Ю., Серденко О. Б., Грабченко Н. І., Козьмін С. Г., Діденко Л. Ф., Співак М. Я. Лектинова активність в листях *Nicotiana rustica*, інфікованих рабдовирусами // Наук. вісн. Ужгород. ун-ту. Сер. біол. – 2006. – № 18. – С. 149–152.
2. Van Regenmortel M. H. V., Fauquet C. M., Bishop D. H. L. Virus Taxonomy. Seventh report of the International Committee on taxonomy of viruses. – New York: Acad. Press, 2000. – 1121 p.
3. Banerjee A. K. Transcription and replication of rhabdoviruses // Microbiol. Rev. – 1987. – 5. – P. 66–87.
4. Wagner R. R. Reproduction of rhabdovirus // Comprehensive Virology / Ed. H. Frankel-Conrat, R. R. Wagner. – New York: Plenum Press, 1975. – P. 1–93.
5. Steiner M., Steiner S. Viral lipids // Microbial lipids / Ed. C. Ratlidge, S. G. Wilkinson. – London: Acad. Press., 1988. – Vol. 1. – P. 83–116.
6. Деревицкая В. А. Гликопротеины РНК-содержащих оболочечных вирусов // Биоорган. химия. – 1983. – 9, № 5. – С. 581–616.
7. Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop D. H. L. et al. Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses // Arch. Virol. – 1995. – Sup. 10. – 586 p.
8. Wagner R. R., Prevec L., Brown F. et al. Classification of rhabdovirus proteins; a proposal // Virology. – 1972. – 10. – P. 1228–1230.
9. Котельникова И. М., Крылов А. В. Липиды при вирусном заражении растений // Вестн. ДВО РАН. – 2001. – № 4. – С. 38–54.

10. Moreau P., Bessoule J. J., Mongland S. et al. Lipids trafficking in plant cell // Prog. Lipid Res. – 1998. – **37**. – P. 371–391.
11. Selstam E., Jackson A. O. Lipid composition of sonchus yellow net virus // Gen. Virology. – 1983. – **64**. – P. 1607–1613.
12. Machamer C. F., Guan J.-L., Rose J. K. Role of glycosylation in protein transport to the cell surface // Virus Res. – 1985. – **3**, Sup. No 1.
13. Диденко Л. Ф., Максименко Л. А., Пархоменко Н. И., Варбанец Л. Д., Броварская О. С., Зарицкий Н. М., Дяченко Н. С. Изучение липидов и углеводов в составе вируса курчавой карликовости картофеля (ВККК). III Міжнар. конф. “Біоресурси та віруси”, 11–15 вер. 2001 р. – Київ, 2001. – С. 69.
14. McSharry J. J., Wagner R. R. Carbohydrate composition of vesicular stomatitis virus // Virology. – 1971. – **7**. – P. 412.
15. Adam G., Heegard P., Bog-Harse T. C., Mundry K. W. Lectins as probed for the assay of rhabdoviruses infection in plants // Virol. Methods. – 1987. – **17**, No 3/4. – P. 263–275.

Інститут мікробіології і вірусології  
ім. Д. К. Заболотного, Київ

Надійшло до редакції 15.11.2006

УДК 634.75:518.143.6.1.051

© 2007

**О. В. Колесніченко, А. А. Клюваденко, М. Д. Мельничук,**  
член-кореспондент НАН України **І. П. Григорюк, П. П. Яворовський,**  
**Сонг Фуджянг**

## **Біотехнологічні аспекти введення в культуру *in vitro* каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.)**

*The conditions of the introduction of Castanea sativa Mill. in culture in vitro have been determined. The structure of sterilizing materials, concentration, and duration of their influence on the initial explants have been established. Specific culture media have been developed for the plants regeneration and for the callus formation. Regenerated plants and callus are obtained for the further study of rhizogenesis and indirect morphogenesis.*

Значна кількість рослин каштана їстівного (*Castanea sativa* Mill.) поступово вичерпує свій адаптивний потенціал і гине від промислового забруднення хімічними речовинами, хвороб, шкідників, посухи тощо [1]. Особливо це стосується великих міст і промислових регіонів, де антропогенний вплив на довкілля перевищує гранично допустимі норми. Розмноження каштана їстівного, одного із основних постачальників кисню для мегаполісів, здійснюють генеративним (насінням) і вегетативним способами (вкоріненням пневої порослі та щепленням). Однак при розмноженні насінням найцінніші ознаки не завжди передаються нащадкам. Тому в останнє десятиріччя спостерігається тенденція постійної заміни насінневого розмноження окремих видів деревних рослин клональним мікророзмноженням у культурі *in vitro* [2]. У теперішній час визнано, що саме метод мікроклонального розмноження дозволяє найповніше реалізувати морфогенетичний потенціал рослинного організму. Використання методу культури *in vitro* відіграє ключову роль в оздоровленні рослин від патогенів, особливо вірусних, та уникненні дефектних ознак, які сконцентровано у генотипі за дії негативних мутацій, хвороб або патогенних організмів [3]. Особливо актуальним такий спосіб