
<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.10.071>

УДК 578.81.+ 578.85/86

**Н.Й. Пархоменко,
Л.О. Максименко, Л.Ф. Діденко**

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

E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

Біологічні та фізико-хімічні властивості вірусу мозаїки цимбідіуму

Представлено членом-кореспондентом НАН України Б.П. Мацелюхом

*Виділений вірус мозаїки цимбідіуму (ВМЦ) є одним з найбільш поширених і небезпечних збудників, який уражує перспективні сорти орхідей. Він зумовлює характерні симптоми на рослинах орхідей, що виявляються у вигляді мозаїки, а з часом ці ділянки некротизуються, призводячи до припинення цвітіння рослин і зменшуючи їх декоративну цінність. ВМЦ не розповсюджується комахами-переносниками, а передається механічною інокуляцією соком. Методом електронної мікроскопії виявлені гнучкі нитчасті вірусні частки завдовжки близько 500 нм. Очищений вірусний препарат седиментує одиночним піком з коефіцієнтом седиментації 142 S. Плавуча щільність вірусу в преформованому градієнті CsCl відповідає $1,3 \text{ г/см}^3$. Електрофоретичний аналіз білків у поліакриламідному гелі в денатурованих умовах показав наявність двох поліпептидів з молекулярною масою 27 і 31 кДа. РНК ВМЦ має молекулярну масу $2 \cdot 10^6$ Да. У системі трансляції з ретикулоцитів кроля *in vitro* синтезується білок з молекулярною масою близько 27 кДа. Одержані дані підтверджують належність ВМЦ до групи потексвірусів.*

Ключові слова: орхідеї, вірус мозаїки цимбідіуму, поліпептиди, РНК.

На даний час виявлено близько 56 типів вірусів орхідей, більшість з яких належить до родів Potyvirus і Rhabdovirus. Найбільш поширеними і шкодочинними вірусами для рослин орхідей є вірус мозаїки цимбідіуму (ВМЦ) і вірус кільцевої плямистості одонтогლოსуму. Вони спричиняють значні збитки господарствам, які займаються промисловим вирощуванням орхідей. Вірусні захворювання зумовлюють зниження інтенсивності росту і репродуктивної здатності уражених рослин, а симптоми, які з'являються на листях і квітах орхідей різко знижують їх декоративні якості [1–3]. ВМЦ є одним із найпоширеніших вірусів на рослинах цимбідіуму і спричиняє значну шкоду та економічні втрати господарствам декоративного садівництва. Він легко передається шляхом інокуляції сусіднім рослинам, зумовлюючи мозаїку і некротичні ураження різних видів орхідей. Коефіцієнт седиментації, за

Цитування: Пархоменко Н.Й., Максименко Л.О., Діденко Л.Ф. Біологічні та фізико-хімічні властивості вірусу мозаїки цимбідіуму. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 10. С. 71–76. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.10.071>

даними [4], становить 121 S. Віріон містить 5,6 % нуклеїнової кислоти, 94 % білка і не містить ліпідів. Геном являє собою одноланцюгову лінійну молекулу РНК, розмір тотального геному близько 8,1 kb [4, 5]. Реплікація не залежить від вірусу-помічника, віріони знаходяться в цитоплазмі клітин. Під час вірусної інфекції в уражених клітинах з'являються осмієфільні глобули в хлоропластах. Молекулярна маса вірусного білка, за літературними даними, близько 27600 кДа (Francki R.I.B., <https://www.vide-manager@biology.anu.edu.au>). Мета нашого дослідження полягала у вивченні фізико-хімічних властивостей ізоляту ВМЦ, який був виявлений на рослинах орхідеї (цимбідіуму гібридного) в колекції Центрального ботанічного саду НАН України та ідентифікований як збудник захворювання орхідей співробітниками цієї ж установи [1].

Матеріали і методи. Виділення вірусу здійснювали за методом [4]. Для цього листя рослин дурману (*Datura stramonium* L.) інфікували інокулюмом з ураженого листя цимбідіуму. Метод виділення ґрунтується на застосуванні циклу низько- і високошвидкісного центрифугування інфікованого матеріалу з подальшим осадженням вірусу поліетиленгліколем. Концентрацію ВМЦ визначали за допомогою спектрофотометра "Specord". Очищені препарати вірусу наносили на сіточки з нітроцелюлозними підтримуючими плівками і контрастували 2 % ураніацетатом. Електронну мікроскопію очищених вірусних препаратів проводили при інструментальному збільшенні в 20 000–40 000 раз. Седиментаційну характеристику очищеного ВМЦ визначали за допомогою методу аналітичного центрифугування із застосуванням шлірен-оптики. Досліджуваний матеріал у концентрації 7,4 мг/мл вносили в кювету центрифуги MOM-3170-B і центрифугували при 22000 об/хв протягом 4 год при 20 °С. Інтервал зйомки становив 2 хв. На отриманих седиментограмах за допомогою мікрокомпаратора проводили виміри, необхідні для визначення коефіцієнта седиментації вірусу [6, 7]. Для визначення плавучої щільності вірусу використовували преформований градієнт CsCl. Фіксований 4 %-м формальдегідом вірусний матеріал нашаровували на 30–50 %-й градієнт CsCl і центрифугували в роторі SW-55 центрифуги Beckman при 35000 об/хв протягом 20 год при 20 °С. Далі на рефрактометрі визначали коефіцієнт заломлення і розраховували значення плавучої щільності вірусу [8]. Електрофорез білка проводили в градієнтному 8–20 %-му ПААГ в денатурованих умовах [9]. З очищеного ВМЦ виділяли РНК і аналізували за допомогою електрофорезу в 2,7 %-му ПААГ в присутності 6 М сечовини [10]. Маркерами були РНК X-вірусу картоплі і тРНК. Трансляцію РНК проводили в безклітинній системі з ретикулоцитів кроля *in vitro* згідно з [11].

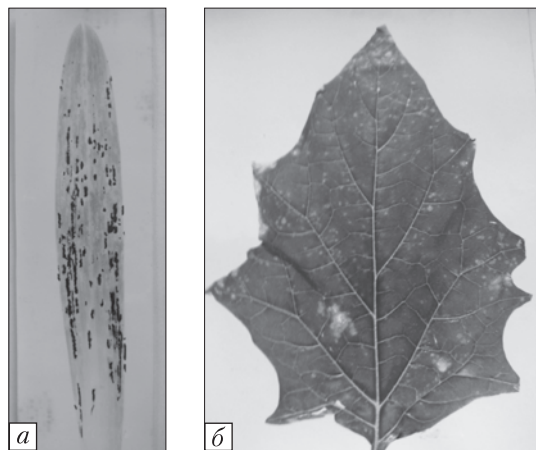


Рис. 1. Симптоми ВМЦ на листку цимбідіуму (а) і дурману (б)

проводили в градієнтному 8–20 %-му ПААГ в денатурованих умовах [9]. З очищеного ВМЦ виділяли РНК і аналізували за допомогою електрофорезу в 2,7 %-му ПААГ в присутності 6 М сечовини [10]. Маркерами були РНК X-вірусу картоплі і тРНК. Трансляцію РНК проводили в безклітинній системі з ретикулоцитів кроля *in vitro* згідно з [11].

Результати і обговорення. На початковій стадії розвитку захворювання на листі цимбідіуму з'являються блідо-зелені смуги, повздовжні плями, розміщені паралельно центральній жилці листка. Ці смуги і плями створюють мозаїчне забарвлення листя цимбідіуму, а з часом ці ділянки некротизуються (рис. 1, а). ВМЦ легко пере-

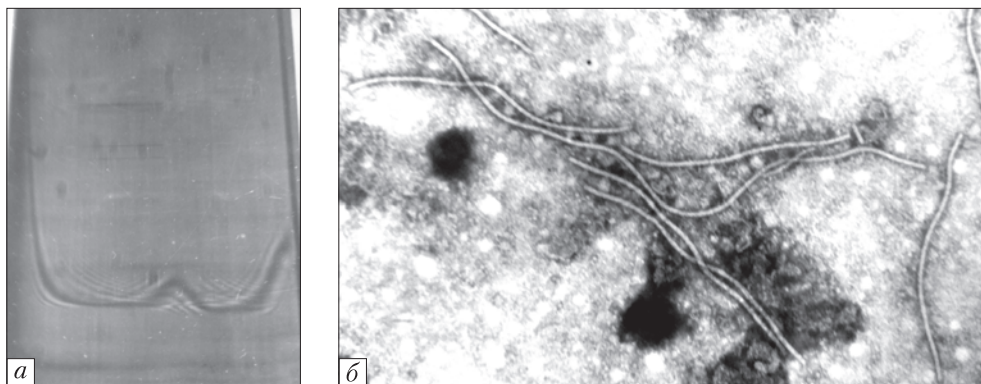


Рис. 2. Седиментограма (а) і електронна мікроскопія (б) часток ВМЦ

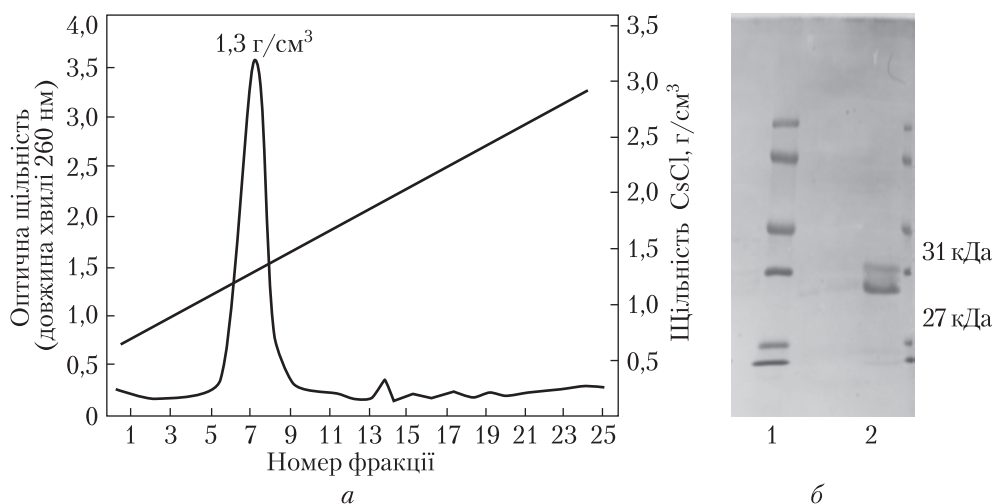


Рис. 3. Плавуча щільність часток ВМЦ (а) і електрофорез білків ВМЦ (б: 1 – маркери, 2 – структурні білки ВМЦ)

дається механічним шляхом, у звичайних умовах часто зустрічається в змішаній інфекції з широко поширеним вірусом кільцевої плямистості одонтогლოსуму. Цей рід орхідей зростає в дикій природі в гірських районах Південної Америки. ВМЦ легко уражує дурман звичайний. Щоб відокремити ВМЦ від можливої присутності вірусу одонтогლოსуму, інкуляцією з уражених ВМЦ рослин орхідей заражали листя дурману, на яких через 14–15 днів розвиваються симптоми захворювання (див. рис. 1, б), типові для ВМЦ [3]. З листя дурману виділяли ВМЦ як описано в [4]. Максимум поглинання очищеного вірусного нуклеопротеїду в УФ спектрі відповідав 265 нм, а співвідношення спектральних значень $E_{265}/248 = 1,09$ і $E_{260}/280 = 1,1$, що є характерною ознакою для очищеного вірусу [4]. ВМЦ седиментував одиночним піком при 22000 об/хв при 20 °С (рис. 2, а). Розрахований нами коефіцієнт седиментації відповідав 142 S.

Електронно-мікроскопічне дослідження очищених нами препаратів вірусу показало, що ВМЦ являє собою гнучкі нитчасті частки завдовжки близько 500 нм і не має домішок іншого вірусу (див. рис. 2, б).

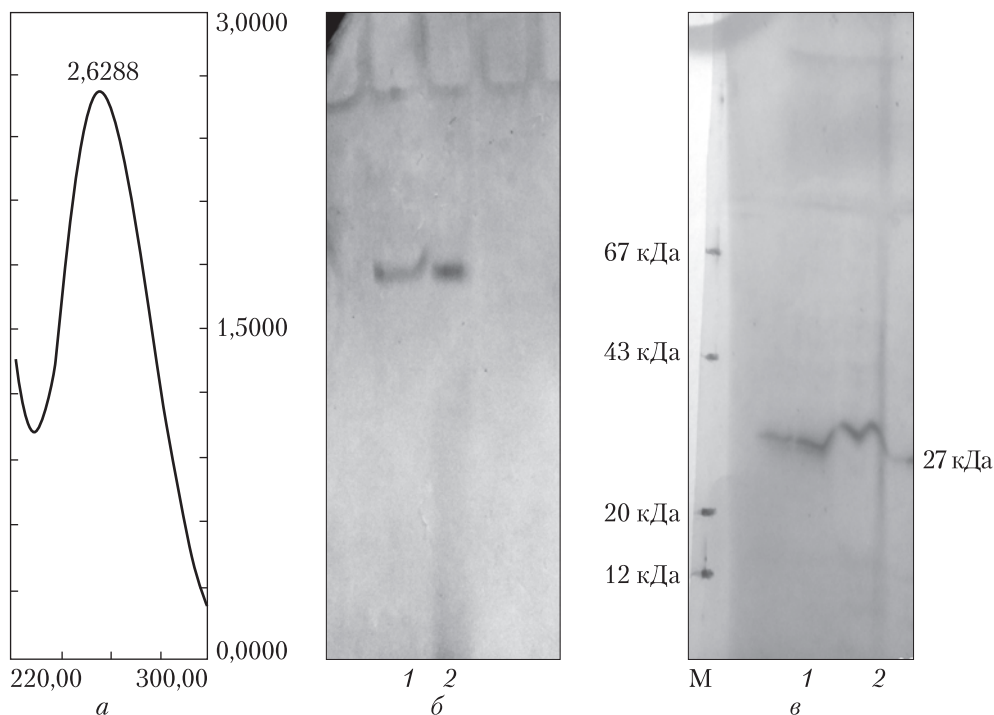


Рис. 4. УФ спектр РНК ВМЦ (а), електрофорез РНК (б: 1 – РНК Х-вірусу картоплі, 2 – РНК ВМЦ) і автограф білка ВМЦ, синтезованого в системі *in vitro* (в)

У реакції подвійної імунодифузії в агарозному гелі з використанням сироватки, отриманої до ВМЦ, нами не було встановлено серологічної спорідненості між ВМЦ і іншим представником групи потексвірусів – Х-вірусом картоплі (ХВК). Цей факт було відмічено також у роботі інших дослідників [4]. Мабуть, у ХВК і ВМЦ відсутні спільні антигенні детермінанти на поверхні структурних вірусних білків, але наявність інших характеристик ВМЦ дає підставу віднести його до групи потексвірусів [12]. За умов фракціонування досліджуваного матеріалу в градієнті CsCl формується одна основна зона, що також свідчить про гомогенність ізолюваного вірусу. Плавуча щільність вірусних часток становить $1,3 \text{ г/см}^3$ (рис. 3, а), що характерно для вірусів потексгрупи [7, с. 94–95]. У випадку фракціонування вірусного препарату ВМЦ в поліакриламідному гелі було виявлено два поліпептидних компоненти з молекулярною масою 27 і 31 кДа (див. рис. 3, б). Отримані дані узгоджуються з результатами робіт інших авторів, які показали, що білок ВМЦ під час електрофорезу в ПААГ розділяється на два поліпептиди з молекулярною масою від 26 до 30,4 кДа [4]. Наявність двох поліпептидів можна пояснити дією протеаз, які розщеплюють білок оболонки ВМЦ. Це припущення підтверджується результатами досліджень, під час яких виділення вірусу здійснювалося в присутності інгібітора протеаз на всіх етапах його ізолювання. За цих умов була присутня лише одна смуга білка ВМЦ з молекулярною масою близько 27 кДа. Слід відзначити, що деяка деградація білкової оболонки спостерігається під час очищення чи зберігання вірусу, але в обох випадках присутність інгібітора протеаз PMSF (фенілметилсульфоніл флуорид) запобігає протеолітичному розщепленню. Можливо, ці зміни мають біологічну значущість процесу, оскільки протеолітичне розщеплення може

бути частиною аутокаталітичного процесу, який бере участь в “роздяганні” вірусу під час його проникнення і репродукції в клітинах рослин.

Вірусна РНК, виділена з очищеного вірусу, мала характерний спектр в ультрафіолетовому світлі з максимумом поглинання при довжині хвилі 260 нм. Значення співвідношень $E_{260}/230 = 2,0$, а $E_{260}/280 = 2,1$ також характеризує чистоту отриманих РНК (рис. 4, а). За результатами фракціонування РНК ВМЦ у 2,7 %-му ПААГ у присутності 6 М сечовини встановлено один рівень розміщення з РНК ХВК, що свідчить про однакове значення їх молекулярних мас – $2 \cdot 10^6$ Да (див. рис. 4, б). Далі РНК ВМЦ у концентрації 4 мкг вносили в систему трансляції з ретикулоцитів кроля *in vitro*. У результаті реакції синтезується білок з молекулярною масою близько 27 кДа (див. рис. 4, в). Одержані дані узгоджуються з результатами досліджень інших авторів [13]. Ними була визначена нуклеотидна послідовність 3'-кінцевої області геному корейського ізоляту ВМЦ. Послідовність мала відкриту рамку зчитування, яка відповідає білку оболонки з 3'-кінця (СР). СР-ген кодує поліпептидний ланцюг з молекулярною масою 23,76 кДа [13].

Таким чином, нами був очищений ізолят ВМЦ із колекції орхідей Центрального ботанічного саду НАН України і вивчено основні його властивості. Вони незначно відрізняються, а за деякими параметрами узгоджуються з результатами інших дослідників. Одержані характеристики підтверджують належність отриманого нами ізоляту ВМЦ до групи потексвірусів. Ці дані можуть мати цінність для подальшого вивчення вірусів орхідей і розробки методів боротьби з ними.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Зірка Т.І., Глушак Л.Ю. Ідентифікація збудників мозаїки цимбідіума (*Cymbidium* sp.). *Доп. АН УРСР*. 1986. № 6. С. 66–69.
2. Толкач В.Ф. Ідентифікація вірусів, виявлених на рослинах родини Orchidaceae в приморському краї. *Вестн. защиты растений*. 2016. № 4. С. 33–37.
3. Steinhart W.L., Oshiro M.A. Gene products encoded by cymbidium mosaic virus RNA: proteins translated *in vitro*. *Plant Sci*. 1990. **72**, Iss. 1. P. 141–147.
4. Frowd J.A., Tremaine J.H. Physical, chemical and serological properties of cymbidium mosaic virus. *Phytopathology*. 1977. **67**, № 1. P. 43–49.
5. Francki R.I. Cymbidium mosaic virus. *C.V.I. Description of Plant Viruses*. 1970. № 27. P. 3.
6. Шкиптер В.О. Методи дослідження біополимерів з допомогою ультрацентрифугування. *Соврем. методы в биохимии*. 1964. **1**. С. 15–37.
7. Практикум по общей вирусологии: Атабеков И.Г. (ред.). Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1981. 191 с.
8. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Москва: Наука, 1981. 250 с.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*. 1970. **227**, № 5259. P. 680–685.
10. Steele K.P., Frist R.N. Characterisation of the 3'-termini of the RNA of Cowpea Mosaic Virus. *J. Virol*. 1983. **26**, № 2. P. 243–248.
11. Пархоменко Н.Й., Діденко Л.Ф., Максименко Л.О., Дяченко Н.С. Матрична активність мРНК різної клітинної локалізації рослин, інфікованих мінус-геномним вірусом кучерявої карликовості картоплі в білоксинтезуючій системі *in vitro*. *Мікробіол. журн*. 2011. **73**, № 3. 54–60 с.
12. Краев В.Г. Современная классификация и номенклатура вирусов растений (по материалам Международного Комитета по таксономии вирусов). Ч. 2. *Мікробіол. журн*. 2001. **63**, № 2. С. 20–69.
13. Lim S.H., Ko M.K., Lee S.J., La Y.J., Kim B.D. Cymbidium mosaic virus coat protein gene in antisense confers resistance to transgenic *Nicotiana occidentalis*. *Mol. Cell*. 1999. **9**, № 6. P. 603–608.

Надійшло до редакції 08.07.2020

REFERENCES

1. Zyrka, T. I. & Glushak, L. Yu. (1986). Identification of mosaic cymbidium pathogens (*Cymbidium* sp.). Dop. AN URSSR, No. 6, pp.66-69 (in Ukrainian).
2. Tolkach, V. F. (2016). Identification of viruses from plants of the family *Orchidaceae* in Primorskii territory. Plant Protection News, No. 4, pp. 33-37 (in Russian).
3. Steinhart, W. L. & Oshiro, M. A. (1990). Gene products encoded by cymbidium mosaic virus RNA proteins translated *in vitro*. Plant Sci., 72, Iss. 1, pp. 141-147.
4. Frowd, J. A. & Tremaine, J. H. (1977). Physical, chemical and serological properties of cymbidium mosaic virus. Phytopathology, 67, No. 1, pp. 43-49.
5. Francki, R. I. (1970). Cymbidium mosaic virus. C.V.I. Description of Plant Viruses, No. 27, p. 3.
6. Shkipiter, V. O. (1964). Research methods of biopolymers using the ultra centrifugation. Modern methods in biochemistry, 1, pp.15-37 (in Russian).
7. Atabekov, I. V. (Ed.). (1981). Practice methods in general virology. Moscow: Izd-vo Mosk. un-ta (in Russian).
8. Ostermann, I. A. (1981). Methods of proteins and nucleic acids investigations. Moscow: Nauka (in Russian).
9. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature, 227, No. 5259, pp. 680-685.
10. Steele, K. P. & Frist, R. N. (1983). Characterisation of the 3'-termini of the RNA of Cowpea Mosaic Virus. J. Virol., 26, No. 2, pp. 243-248.
11. Parkhomenko, N. I., Didenko, L. F., Maksymenko, L. A. & Dyachenko, N. S. (2011). Matrix activity of mRNP of different cell localization from plants infected by minus-genome curly potato dwarfness virus in proteinsynthesizing system *in vitro*. Mikrobiol. Zhurn., 73, No. 3, pp. 54-60 (in Ukrainian).
12. Kraev, V. G. (2001). Current classification and nomenclature of plant viruses (from the materials of the International Committee on Virus Taxonomy). Pt. 2. Mikrobiol. Zhurn., 63, No. 2, pp. 20-69 (in Russian).
13. Lim, S. H., Ko, M. K., Lee, S. J., La, Y. J. & Kim, B. D. (1999). Cymbidium mosaic virus coat protein gene in antisense confers resistance to transgenic *Nicotiana occidentalis*. Mol. Cell., 9, No. 6, p. 603-608.

Received 08.07.2020

N.I. Parkhomenko,

L.A. Maksymenko, L.F. Didenko

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

BIOLOGICAL AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF CYMBIDIUM MOSAIC VIRUS

The isolated cymbidium mosaic virus (CMV) is one of the most wide-spread and dangerous pathogens that infects promising varieties of orchids. It causes characteristic symptoms on orchid plants, which are manifested in the form of a mosaic. Over time, these areas are necrotized, leading to the stop of flowering the plants and reducing their decorative value. The CyMV is not spread by insects-carriers, but is transmitted by the mechanical inoculation with juice. Electron microscopy revealed flexible filamentous viral particles with a length of about 500 nm. The purified viral preparation is sedimented with a single peak with a sedimentation coefficient of 142S. The floating density of the virus in the preformed CsCl gradient corresponded to 1.3 g/cm³. The electrophoretic analysis of proteins in polyacrylamide gel under denatured conditions showed the presence of two polypeptides with molecular weights of 27 and 31 kDa. RNA CyMV has a molecular weight of 2 · 10⁶ Da. In the translation system of rabbit reticulocytes *in vitro*, a protein with a molecular weight of about 27 kDa is synthesized. The obtained data allow us to refer CyMV to the group of potexviruses.

Keywords: orchids, cymbidium mosaic virus, polypeptides, RNA.