

УДК 629.7.081:578.824

## Влияние клиноостативирования на вирус курчавой карликовости картофеля *in vitro* и *in vivo*

Л. Ф. Диденко<sup>1</sup>, Н. И. Пархоменко<sup>1</sup>, Л. А. Максименко<sup>1</sup>,  
Н. С. Дяченко<sup>1</sup>, Н. М. Зарицкий<sup>2</sup>, Ф. Е. Козар<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт мікробіології та вірусології НАНУ, Київ

<sup>2</sup>Институт сільськогосподарської мікробіології УААН, Чернігів

Надійшла до редакції 29.06.99

---

Фігарабовірус кучерявої карликовості картоплі, експонований *in vitro* в умовах клиноостативування, зберігає інфекційність. Проте структурні вірусні білки, синтезовані в рослинах, інфікованих до' та після клиноостативування, відрізняються своїм кількісним співвідношенням, характерним для нативного вірусу.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Предметом изучения является вирус курчавой карликовости картофеля (ВККК), выявленный впервые Ф. Е. Козаром с сотрудниками [1] в Украине в Черниговской области.

По морфологическим и биохимическим особенностям ВККК относится к семейству рабдовирусов, которое включает также вирус бешенства и вирус везикулярного стоматита. Структурная организация этих вирусов, содержащих минус-геномную РНК, обуславливает наличие ферментов: транскриптазы, полиА-полимеразы и протеинкиназы [4, 10, 12]. Изучение рабдовируса в условиях невесомости представляет особый интерес. Поскольку факторы космического полета могут изменить активность этих ферментов, то можно в будущем использовать этот вирус как источник уникальных ферментов.

Условия космического полета также могут нарушить или изменить целостность структурных компонентов фитовирусов, что в конечном итоге может повлиять на экспрессию их генома [3]. С другой

стороны, факторы космического полета приводят к изменению структурных особенностей растительной клетки, и при этом происходит изменение ее мембранного аппарата [9]. Это, в свою очередь, может повлиять на синтез вирусспецифических молекул в процессе взаимодействия клетки с вирусами, так как их репродукция тесно связана с мембранными структурами клетки, более чувствительными к воздействию факторов космического полета [6]. Поэтому интересно было исследовать влияние факторов космического полета на инфекционные свойства вируса курчавой карликовости картофеля и особенности его репродукции в растениях, экспонированных в условиях микрогравитации.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Растения махорки (*Nicotiana rustica*) заражали соком больных растений. В ряде случаев растения инфицировали очищенным вирусом в концентрации 1 мг/мл. Для механического повреждения

листьев использовали «Celite Type 535» фирмы «Serva».

Выделение вируса осуществляли следующим образом. Листья махорки с ярко выраженными симптомами заболевания гомогенизировали в жидком азоте. К гомогенату добавляли буфер, содержащий 0.1 М глицин, 0.01 М  $MgCl_2$ , 0.01 М  $Na_2SO_3$ , pH 8.0. Затем фильтровали через нейлоновый фильтр. Фильтрат центрифугировали при 5000g в течение 10 мин. Из надосадочной жидкости вирус осаждали 7-м % полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) при наличии 0.15 М NaCl. Преципитированный ПЭГ-м вирус собирали центрифугированием при 10000g в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в буферном растворе pH 7.0, содержащем 0.1 М глицин, 0.01 М  $MgCl_2$ . Затем от ПЭГ освобождались центрифугированием при 10000g в течение 15 мин.

Чистоту вирусного препарата контролировали электронномикроскопическим методом. Для этого вирусную суспензию наносили на сеточки с формваровыми пленками-подложками, контрастировали 2 % ФВК pH 6.8 -7.0 и исследовали в электронном микроскопе ЭМБ-100.

Диагностическую сыворотку получали путем иммунизации кроликов очищенным ВККК в концентрации 1 мг/мл с применением адъюванта Фрейнда. Вирус в соке инфицированных растений выявляли методом двойной иммунодиффузии в геле [11]. Для детекции вирусов по Оухтерлони во всех случаях использовали одинаковые навески листьев.

Молекулярную массу вирусных белков определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Лаэммли [7].

Вирус экспонировали в условиях микрогравитации, имитируемой посредством клиностатирования, следующим образом. Вирусную суспензию в концентрации 1 мг/мл помещали в пенициллиновые флаконы, которые крепили на пенопластовую платформу, расположенную в металлическом стакане. Клиностатирование проводили в холодильной камере при +4 °С на клиностате, вращающемся в горизонтальной плоскости со скоростью 2 об/мин. Клиностат изготовлен НПО «Респиратор» (Донецк).

Вирусный препарат клиностатировали в течение 7, 14, 21 и 28 сут. В качестве контроля использовали вирусный препарат, инкубированный в тех же условиях, но без клиностатирования. Для заражения опытным и контрольным вирусным препаратом использовали 4-недельные растения *N. rustica*.

Для клиностатирования использовали 4-недельные растения *N. rustica*. С этой целью предварительно выращенные в теплице одновозрастные растения высаживали в стерильную почву в торфяных

горшках, которые в свою очередь помещали в металлические цилиндры. Нижним основанием цилиндры крепили к клиностату, а верхний слой почвы укрепляли пенопластовым диском с отверстием для стебля. На боковой поверхности цилиндра находились 3 мм в диаметре отверстия, предназначенные для полива растений. Полив осуществлялся с помощью шприца. Клиностатирование растений проводили при температуре +23 °С при дневном освещении. После окончания клиностатирования растения выращивали в теплице до проявления максимально выраженной патологии растений, которая проявлялась в отставании роста растений, измельчении и скручивании листьев. После этого из этих растений выделяли вирус и исследовали его структурные белки.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Объектом исследований является вирус курчавой карликовости картофеля, изолированный из растительной *Nicotiana rustica*, для хранения которого использовали жидкий азот. По данным электронной микроскопии вирусный препарат не содержит примеси других вирусных частиц (рис. 1).

Установлено, что инфекционные свойства ВККК сохраняются в условиях клиностатирования в течение всего исследованного периода (28 сут). При проведении серологических исследований было установлено, что растения, инфицированные клиностатированным и контрольным вирусом, давали

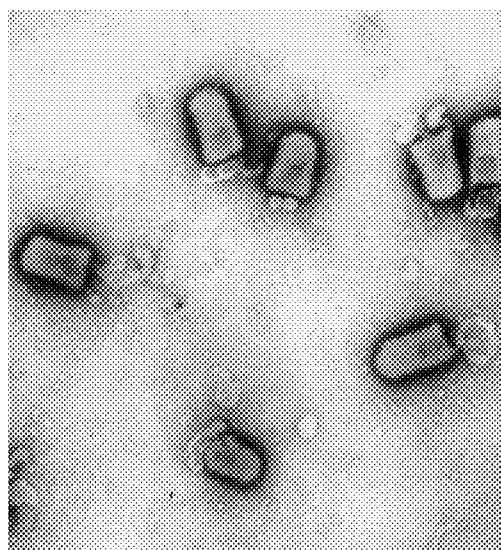


Рис. 1. Электронная микрофотография очищенного вируса курчавой карликовости картофеля

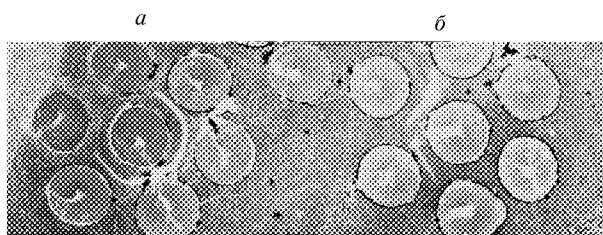


Рис. 2. Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони: *а* — сок растений, инфицированных вирусом после клиностаტიрования; *б* — сок растений, инфицированных вирусом перед началом клиностаტიрования

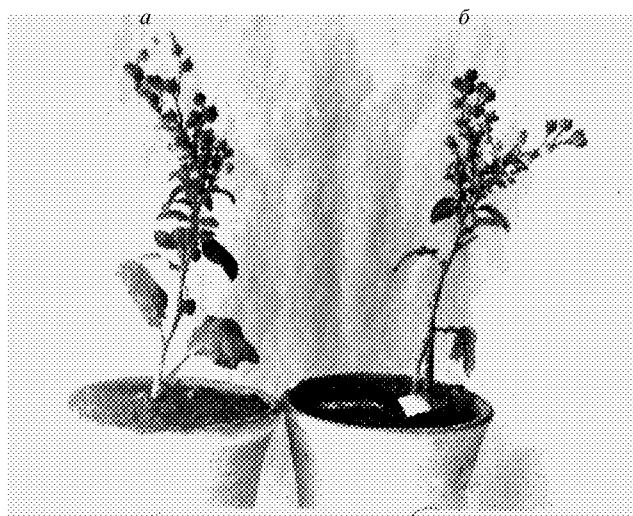


Рис. 3. Растения махорки: *а* — инфицированное клиностаტიрованным вирусом; *б* — инфицированное контрольным вирусом

положительную реакцию с антисывороткой, полученной к нативному вирусу (рис. 2), что свидетельствует о накоплении вируса в растениях. При этом на весь период в разные сроки растения, пораженные клиностаტიрованным и контрольным вирусом, в росте и развитии, а также по признакам заболевания мало отличались (рис. 3).

Другая закономерность наблюдалась при инфицировании клиностаტიрованных растений. В случае инфицирования вирусом растений в начале клиностаტიрования наблюдался замедленный рост растений в отличие от растений, инфицированных вирусом после 3-недельного клиностаტიрования и впоследствии развивающихся в обычных условиях (рис. 4). По-видимому, отставание роста растений, инфицированных ВККК в начале клиностаტიрования, прежде всего обусловлено вирусной инфекцией, вызывающей карликовость растений. Протяженность вирусного патогенеза в растениях махорки в течении трех недель достаточна для проявле-

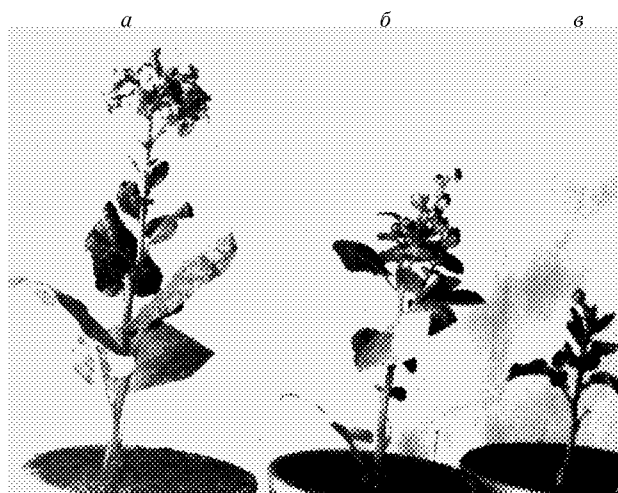


Рис. 4. Клиностаტიрованные растения махорки: *а* — здоровое, не клиностаტიрованное; *б* — инфицированное вирусом после окончания клиностаტიрования; *в* — инфицированное вирусом перед клиностаტიрованием

ния этой карликовости визуально. Хотя нельзя отрицать и возможное влияние клиностаტიрования на развитие уже инфицированных растений.

В другом варианте опыта растения, инфицированные через три недели после клиностаტიрования, отличались по своему развитию, по-видимому, потому, что инфицирование растений было смещено по времени на три недели. Поскольку в обоих случаях клиностаტიрование растений проводили одновременно, а только инфицирование растений осуществляли до и после клиностаტიрования, поэтому отставание в росте и развитии растений одних по отношению к другим, возможно, вызвано вирусной инфекцией. Микроскопический контроль не показал инфицирования растений другими микроорганизмами. Кроме того, здоровое клиностаტიрованное растение от неклиностаტიрованного по своему развитию почти не отличалось.

С другой стороны, нельзя исключить, что растение, инфицированное после клиностаტიрования, а затем перенесенное в обычные условия, возможно, использует репарационные возможности, способные восстанавливать некоторые функциональные изменения, вызванные микрогравитацией. Однако в условиях микрогравитации возможны физиолого-биохимические и структурные изменения растительной клетки, обеспечивающие восприимчивость растений к вирусам. Свидетельством этому служит то, что инфицированные клиностаტიрованные растения содержали меньше вируса по сравнению с растениями, которые заражали уже после клиностаტიрова-

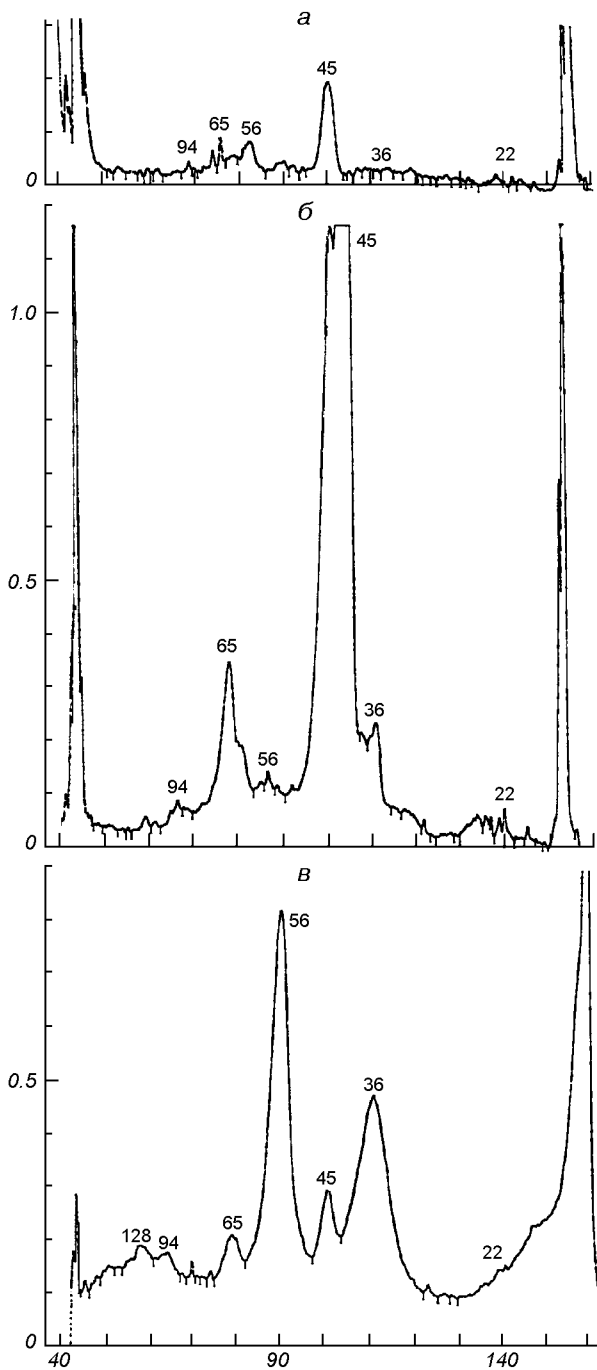


Рис. 5. Денситограмма геля электрофоретического фракционирования белков: а — ВККК, выделенного из растений, зараженных перед началом клиностатирования; б — ВККК, выделенного из растений, зараженных после окончания клиностатирования; в — контрольного вируса

ния (рис. 5). Можно предположить, что репродукция вируса в растениях, экспонированных в условиях микрогравитации, также претерпевает неко-

торые изменения. Поэтому было важно выделить из этих растений вирус и изучить возможность изменения его компонентов. С этой точки зрения заслуживают внимания вирусные структурные белки, ответственные за экспрессию минус-геномной РНК ВККК.

Согласно с обозначением, принятым в работе [10], белки классифицированы следующим образом: G (65—90 кДа) — гликопротеид, присутствующий на поверхности вириона; M (20—30 кДа) — мембранный белок, заполняющий пространство между нуклеокапсидом и липопротеидной оболочкой, N (47—62 кДа) — структурный белок, образующий чехол, в который упакована геномная РНК; NS (40—50 кДа) и L (150—190 кДа) — нуклеокапсидные белки, обладающие транскриптазной активностью.

Электрофоретический анализ белков вирусов, выделенных из инфицированных непосредственно перед клиностатированием растений, показал, что эти растения содержали меньше вирусных белков, чем растения, инфицированные после 3-недельного клиностатирования (рис. 5), что согласуется с результатами серологического анализа (рис. 3).

В результате проведенных исследований отмечается минимальное содержание мембранных белков 22 и 36 кДа в составе ВККК, изолированного из растений, инфицированных до и после клиностатирования в сравнении с их содержанием в вирионе, изолированном из контрольных растений. Кроме того, в обоих вариантах наблюдается увеличенное содержание белка 45 кДа, который по молекулярной массе соответствует нуклеокапсидному белку NS. Однако такое содержание белка NS, обладающего транскриптазной активностью, маловероятно, поскольку в рабдовирусах этот белок, как правило, обнаруживается в минимальных количествах. В нашем случае этот мажорный белок 45 кДа, возможно, представляет собой суммарные белки — белок NS и продукты деградации или неоконченного синтеза другого нуклеокапсидного белка N — 56 кДа. Белок 65 кДа скорее всего является гликопротеидом G, увеличенное содержание которого отмечается в растениях, инфицированных после клиностатирования.

Согласно работе [6] факторы космического полета в ряде случаев приводят к изменению мембранного аппарата растительной клетки. В этой связи интересно отметить, что белок G рабдовирусов человека и растений синтезируется на мембрано-связанных полисомах [5, 8], являющихся неотъемлемой частью мембранного аппарата клетки. В нашем случае изменение мембранного аппарата клеток растений *N. rustica* в условиях клиностати-

рования также возможно, поскольку наблюдается изменение количества белка G в вирусном препарате из клиностазированных растений по сравнению с контрольным вирусом.

Таким образом, в растениях, экспонированных в условиях микрогравитации, нарушается количественное соотношение структурных белков ВККК, что играет определенную роль в морфогенезе и некоторых других особенностях синтеза вирусспецифических макромолекул. Вероятно, это обусловлено нарушением мембранных структур клетки.

1. Козар Ф. Е., Курбала М. Л., Щербина Н. В. и др. Курчавая карликовость — вирусная болезнь картофеля, вызванная бациллоидным вирусом из группы рабдовирусов // Вирусные болезни сельскохозяйственных культур. — М., 1980.— С. 69—76.
2. Максименко Л. А., Краев В. Г., Диденко Л. Ф. и др. Исследование РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса курчавой карликовости картофеля // Микроб. журн.— 1994.—56, № 5.—С. 90.
3. Chang D., Paulsen A., Johnson T. C., et al. Virus protein assembly in microgravity // Adv. Space Res.—1993.—13.— P. 251—257.
4. Didenko L. F., Parkhomenko N. I., Maksimenko L. A., et al. Physico-chemical and functional peculiarity of phytorhabdovirus curly potato dwarf virus (CPDV) // II International conference «Bioresources and viruses». — Kyiv, 1998.—P. 120.
5. Grubman M. J., Ehrenfeld. E., Summers D. F. In vitro synthesis of proteins by membrane-bound polyribosomes from vesicular stomatitis virus infected Hela-cells // J. Virol.—1974.—14.— P. 560—571.
6. Kordyum E. L. Effects of altered gravity on plant cell processes: results of recent space and clinostatic experiments // Adv.

Space Res.—1994.—14, N 8.—P. 77—85.

7. Laemmli V. K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227, N 5259.—P. 620—685.
8. Milner J. J., Jackson A. O. Sequence complementarity of Sonchus yellow net virus RNA with RNA from polysomes of infected tobacco // Virology.—1979.—97, N 1.—P. 90—99.
9. Moore R. How effectively does a clinostat mimic the ultrastructural effects of microgravity on plant cells? // Ann. Bot. (USA).—1990.—65, N 2.—P. 213—216.
10. Murphy F. A., Fauquet C. M., Bishop H. L., et al. Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Virology Division International Union of Microbiological Societies) — Springer Verlag Wien New York Archives of Virology, 1995 Supplement 10, P. 275—288.
11. Ouchterlony O. In handbook immunodiffusion and immunoelectrophoresis // Ann. Arbor. Michigan. Ann. Arbor. Science Publishers.—1968.—P. 37.
12. Wagner R. R. Reproduction of rhabdovirus // In comprehensive virology / Eds H. Fraenkel-Conrat, R. R. Wagner. — New York: Plenum Press, 1975.—P. 1—93.

---

#### INFLUENCE OF CLINOSTATING ON THE CURLY POTATO DWARF VIRUS IN VITRO AND IN VIVO

L. F. Didenko, N. I. Parkhomenko, L. A. Maksimenko,  
N. S. Dyachenko, N. M. Zaritskiy, and F. E. Kozar

It is shown that the phytorhabdovirus the curly potato dwarf virus (CPDV) retains its infection properties under the clinostating conditions. However, the structural virus proteins synthesized in plants infected before and after clinostating differ by their quantity ratio characteristic for the native virus.