

I. M. Furtat, L. O. Mykhalsky, T. M. Nogina, F. P. Demyanenko

THE SPECTRUMS OF SURFACE PROTEINS *Corynebacterium glutamicum* ON DIFFERENT PHASES OF CULTURE DEVELOPMENT

The surface proteins spectrum of the cell wall the strains of *Corynebacterium glutamicum* 22L, E531 i VNIIGenetika 90 on different phases of culture development were studied. It was shown that during growth *C. glutamicum* a certain changes on surface proteins composition occurred. The proteins that are detected only in some strains or on the certain phase of cultures development are characterized. The proteins spectrums presented in all investigated samples irrespective of strains and of culture age are revealed. The patterns of all studied cultures are characterised by presence of the most intensively expressed proteins with Mm 85,0; 62,0; 39,0; 16,0 i 13,5 kDa, that can be considered as general prevailing proteins these strains. The preparations of 24 hours of cultures, which most full reflect individuality of proteins profiles strains, can be recommended for comparative investigations of surface proteins composition of various corynebacteria species.

УДК 578.85/865

Рижкова А. Є., Поліщук В. П.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДВОХ ВІРУСІВ, ВИДІЛЕНИХ З ОГІРКІВ ТЕПЛИЧНИХ ГОСПОДАРСТВ УКРАЇНИ

Охарактеризовано та досліджено властивості двох вірусів, що уражують огірки закритого ґрунту. Встановлено, що дані віруси є ізолятами вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірків групи *Tobamovirus*. Виявлено відмінності у властивостях досліджуваних ізолятів від типового представника даної групи – ВТМ.

Серед вірусів, що спричиняють значні втрати врожаю огірків, найбільш відомими є: вірус огіркової мозаїки (ВОМ-1; CMV) родини Bromoviridae, вірус мозаїки кавунів (ВМК; WMV) родини Potyviridae та вірус зеленої крапчастої мозаїки огірків (ВЗКМО, ВОМ-2; CGMMV) групи *Tobamovirus* [3]. На відміну від ВОМ-1 та ВМК, що найбільшої шкоди завдають огіркам відкритого ґрунту, ВЗКМО зустрічається лише на рослинах, які вирощуються в закритому ґрунті. Коло рослин-живителів цього вірусу обмежується родиною гарбузових. На листях уражених рослин розвивається темно-зелена плямистість, з'являються пухирчасті здуття. На відміну від ВОМ-1 та ВМК ВЗКМО не має переносників, але передається за допомогою насіння та через ґрунт. Вірус може витримувати тривале висушування та зберігати інфекційність в гербарному матеріалі протягом 11 місяців.

ВЗКМО – РНК-вмісний тобамовірус, за морфологією, біохімічними та біофізичними властивостями подібний до ВТМ – найбільш вивченого представника даної групи. Незважаючи на загальну подібність просторової організації, гомологія первинної структури ВТМ та ВЗКПО досягає лише 36 %. Чисельні штами ВЗКМО, що були знайдені в Європі та Азії, за класифікацією Окада розподіляють на чотири групи: типовий ОВ-3, аукуба мозаїки ОВ-4, кавуновий ВЗКМО-К (CGMMV-W), огірковий ВЗКМО-О (CGMMV-C)(1).

Метою даної роботи було вивчення властивостей двох вірусів, виділених з огірків тепличних господарств України.

Рослинні зразки відбирали шляхом візуального обстеження теплиць на наявність симптомів вірусної етіології. Віруси з рослинного матеріалу виділяли за такою методикою [1]. Листя

огірків гомогенізували в 0,1М фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) рН 7,4 з додаванням 0,001 М ЕДТА. Освітлювали хлороформом у співвідношенні 1 : 4, після чого проводили низькошвидкісне центрифугування (5000 об./10 хв). Надосад відбирали, додавали 8 %-й ПЕГ і 1,2 % NaCl та інкубували 12–16 год при +4 °С на магнітній мішалці. Центрифугували при 7000 об./40 хв, осад розливали в 0,05М ФСБ та проводили високошвидкісне осадження вірусу крізь 20 %-ну сахарозну подушку (27000 об./100 хв). Проводили два цикли диференційного центрифугування. Концентрацію вірусу визначали спектрофотометрично.

Електронномікроскопічні дослідження проводили на мікроскопі «JEM-100В». Для приготування препаратів використовували мідні сітки з формваровою плівкою-підкладенкою. В якості контрастера використовували 2 %-й водний розчин уранілацетату.

Молекулярну масу капсидного білка визначали методом електрофорезу, за Laemmli, в 14 %-му поліакриламідному гелі [2]. Гель забарвлювався розчином кумасі R250 («Serva», Німеччина).

Специфічну поліклональну сироватку отримували шляхом імунізації кроля очищеним препаратом вірусу. Імунізацію проводили в три етапи з тижневими інтервалами. Концентрація антигена становила 1 мг/мл. Реімунозували тварини через 30 днів після останньої імунізації. Титр сироватки встановлювали методом імуноферментного аналізу. Аналіз проводили в модифікації непрямий твердофазний ІФА на полістиролових планшетах «Labssystem». В якості антивидових антитіл використовували антикролячі антитіла, кон'юговані пероксидазою хрому «Bio Rad». Ферментативну активність утвореного комплексу проводили на рідері «Dynatech» при довжині хвилі 492 нм.

Нами були обстежені тепличні господарства Дніпропетровської та Миколаївської областей, в яких вирощують огірки. Відбирали рослини з характерними проявами системної інфекції: мозаїка листкової пластинки, призупинка росту, опадання квітконосу, деформація плодів та ін. Подібне інфікування рослин призводило до значних втрат врожаю та завдавало великих економічних збитків господарствам.

Віруси були виділені з рослин *Cucumis sativus* сорт «Маринда» (Миколаївська обл.) – ізолят 1 та *C. sativus* сорт «Біанка» (Дніпропетровська обл.) – ізолят 2. Показник $E_{260/280}$ очищеного препарату ізолятів становив 1,36. У ре-

зультаті електронномікроскопічних досліджень соку уражених рослин, а в подальшому – концентрованих препаратів обох ізолятів було виявлено гнучкі паличкоподібні структури довжиною 275–300 нм та близько 15 нм у діаметрі (рис. 1).

Для встановлення кола рослин-індикаторів досліджуваних вірусів проводили механічне ураження рослин – *Cucumis sativus*, *Datura stramonium*.

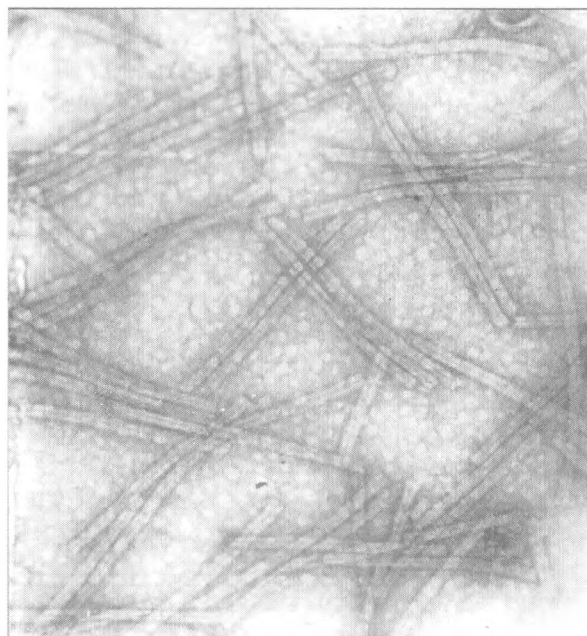


Рис. 1. Електронномікроскопічне зображення очищеного препарату вірусу (ізолят 1). (х 80000)

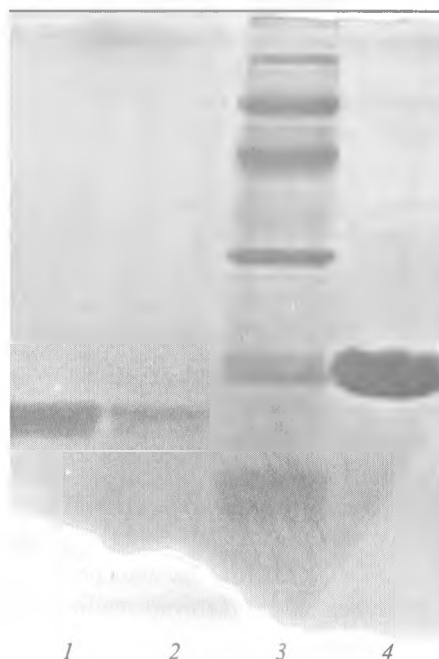


Рис. 2. Електрофореграма порівняння молекулярних мас капсидних білків виділених ізолятів (1, 2) та ВТМ (4): 1 – ізолят 1; 2 – ізолят 2; 3 – маркерні білки; 4 – ВТМ

monium, Nicotiana tabacum. На рослинах *Datura stramonium* та *Nicotiana tabacum* симптоми не проявлялися. На *Cucumis sativus* різних сортів виділені ізоляти викликали системну інфекцію.

Отримані дані дали змогу попередньо віднести виділені віруси до вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірка (Tobamovirus) та в подальшому проводити порівняння біологічних властивостей даних вірусів з типовим представником цієї групи – ВТМ.

Електрофоретичні дослідження виділених вірусів виявили один структурний компонент з молекулярною масою близько 17 кДа для обох ізолятів, тоді як для ВТМ показник молекулярної маси капсидного білка становив близько 19,5 кДа (рис. 2).

В подальшому була отримана діагностична поліклональна кроляча сироватка до ізоляту 1, титр якої в непрямому ІФА становив 1 : 120000 (рис. 3).

Для ідентифікації та встановлення серологічної спорідненості між двома виділеними ізолятами проводили ІФА в модифікації непрямий твердофазний ELISA. Специфічна сироватка до ВЗКМО та позитивний контроль були люб'язно надані професором Т. Кьоном (Ашерслебен, Німеччина). За результатами ІФА отримана нами поліклональна сироватка реагувала з позитивним контролем, а сироватка до ВЗКМО реагувала з обома виділеними ізолятами, тоді як сироватка до ВТМ була специфічна тільки щодо ВТМ (рис. 4).

За результатами проведених досліджень встановлено, що виділені нами віруси належать до двох огіркових ізолятів вірусу зеленої крапчастої мозаїки огірків (ВЗКМО-О). Виявлено, що на відміну від типового представника тобамовірусів ВТМ, що має жорстку структуру, за даними електронної мікроскопії досліджувані віруси мають форму гнучких паличок. Також

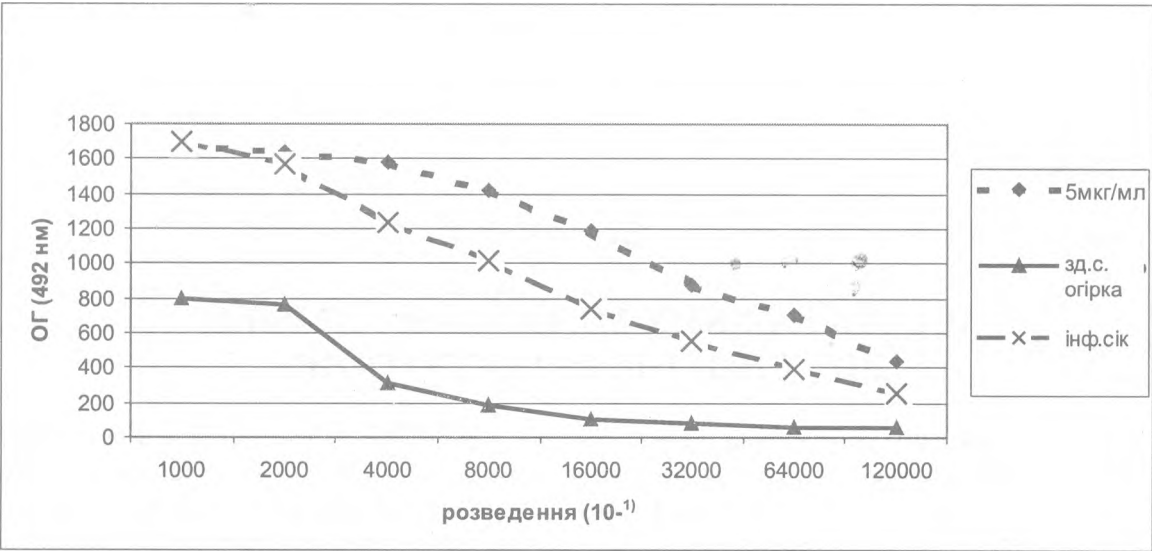


Рис. 3. Розтитровка специфічної поліклональної кролячої сироватки, отриманої до ізоляту 1

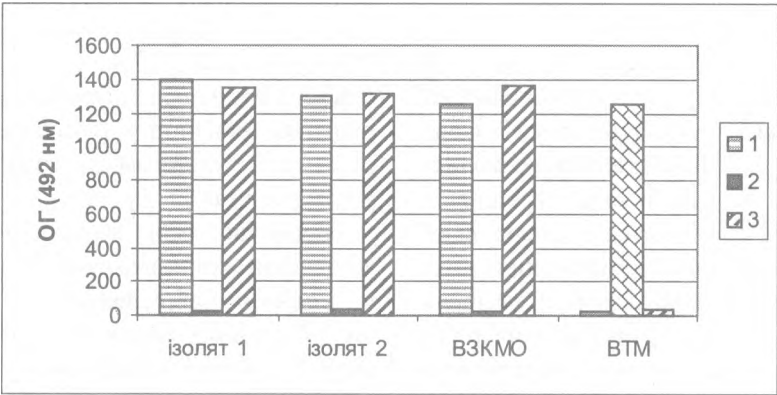


Рис. 4. Результати ІФА: 1 – специфічна сироватка до ізоляту 1; 2 – специфічна сироватка до ВТМ; 3 – специфічна сироватка до ВЗКМО

виявлено відмінності у показниках молекулярної маси капсидних білків досліджуваних вірусів та ВТМ. За результатами імуноферментного аналізу виділені ізоляти взагалі не мають сероло-

гічної спорідненості з ВТМ, що зумовлено низьким ступенем серологічної спорідненості (за літературними даними).

1. Одинцова Т. И., Андреева Э. Н., Пухальский В. А., Мусолямов А. Х., Егоров Ц. А. Структурный анализ белка оболочки вируса крапчатой мозаики огурца // Биохимия.— 2000.— Т. 65.— Вып. 5.— С. 672–679.

2. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.— 1970.— 227.— N 15.— P. 608–685.

3. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.— Academic Press, 2000.— 1162 p.

A. Ryzhkova, V. Polishchuk

BIOLOGICAL PROPERTIES TWO VIRUSES ISOLATED FROM GREENHOUSES UKRAINE

Characterized and research properties two viruses causing cucumbers in greenhouses. These viruses are isolates of cucumber green mottle mosaic tobamovirus.

УДК 574.64

Шевченко О. В., Будзанівська І. Г., Шевченко Т. П., Поліщук В. П.

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПЕРЕБІГ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ТЮТЮНУ

Внаслідок суттєвого забруднення ґрунтів деяких регіонів України сполуками важких металів виникла потреба дослідити їх вплив на розвиток фітовірусної інфекції (Х-вірус картоплі). Виявилося, що внесення важких металів у ґрунт у ГДК не впливало на строк появи симптоматики на рослинах тютюну (*Nicotiana tabacum* cv. *trapeson*). Однак сумісний вплив важких металів та вірусної інфекції призводив до збільшення концентрації хлорофілу у дослідних рослинах і частково компенсував вплив вірусної інфекції на рослини. Це свідчить про те, що підвищена концентрація окремих важких металів у ґрунті може частково нівелювати вплив біотичного стресу, спричиненого вірусною інфекцією рослин.

Останнім часом у зв'язку з бурхливим розвитком промисловості спостерігається значне підвищення рівня важких металів в навколишньому середовищі. Збільшені концентрації важких металів можуть призводити до загальних неспецифічних фізіологічних та біохімічних змін, серед яких виділяють пошкодження мембран, зміну активності ферментів, інгібування росту коренів та ін. [7, 8, 9]. Ці первинні зміни можуть спричинити гормональний дисбаланс, дефіцит

окремих елементів, інгібування фотосинтезу, порушення транспорту фотоасимілятів та водного режиму. Результатом цих змін є уповільнення росту рослини [5, 6].

Водночас треба зважати на те, що разом з абіотичним компонентом стресу (радіоактивним чи хімічним забрудненням) у біоценозах існує ще й біотичний компонент [10]. Одним з індукторів біотичного стресу рослин є вірусна інфекція.