

Природный биоиндикатор — вирус табачной мозаики из растительных сообществ различных регионов Украины

С. А. Степанюк, О. М. Гарифулин¹

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
252017, Киев, ул. Владимирская, 64

¹ Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
2552143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Проведен скрининг вирусинфицированного материала растений семейства пасленовых различных регионов Украины. Установлено, что растения этого семейства инфицируются комплексно вирусами различных групп, причем постоянным участником коинфекции является ВТМ. Выделены 16 изолятов ВТМ (9 табачных и 7 томатных), полученных соответственно из с. Народичи, Житомирской обл. и Пущи-Водицы Киевской обл. Осуществлена ПЦР-амплификация одного из функциональных сайтов вирусного генома — участка, кодирующего последовательность С-концевого фрагмента капсидного белка, с последующим сиквенированием специфического продукта реакции. В результате все изоляты можно отнести к ранее выделенным в этих регионах и охарактеризованным нами штаммам TVM NT9 и TVM LE7. Полученные данные позволяют сделать вывод о возможном использовании ВТМ в качестве модельного биологического индикатора изменений, происходящих в экологических нишах. И, в свою очередь, характеристики ВТМ из отобранных изолятов могут представлять собой реперные данные.

Введение. Своеобразие создавшейся в настоящее время экологической ситуации, связанное с резким возрастанием антропоического фактора на процессы, происходящие в биосфере, вполне может способствовать появлению вирусных популяций с различными свойствами, вплоть до возникновения новых штаммов, как это было показано нами ранее [1, 2].

В связи с этим представляется важным проведение скрининга вирусинфицированного материала из различных регионов Украины для осуществления экологического мониторинга биоценозов [3, 4]. Полученные данные позволят определить изменения как в качественном (изменение ряда биологических и физико-химических свойств известных вирусов или вирусных групп), так и в количественном составе (обнаружение новых вирусных вариантов, увеличение спектра представителей вирусной этиологии, участвующих в процессе комплексного инфицирования растений).

В данной работе мы попытались на примере растений семейства пасленовых, во-первых, определить вирусспецифичность инфицированного материала и, во-вторых, охарактеризовать вирус (или вирусную группу), наиболее часто присутствующий в выборках, для его дальнейшего использования в качестве возможной модели биологического индикатора и в какой-то мере являющегося репером определенной экологической ниши.

Материалы и методы. Инфицированный материал отбирали из растений семейства пасленовых: *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum rostratum*, *Solanum tuberosum*, произрастающих, в основном, на темно-серой оподзоленной почве из восьми различных регионов Украины: Чернобыльская зона; с. Народичи Житомирской обл.; пос. Корнин Житомирской обл.; г. Новоград-Волынский Житомирской обл.; Пуща-Водица, Киевщина; Крым; пос. Канев Черкасской обл.; г. Кировоград.

При отборе инфицированных растений исследу-

дования проводили на 10 % площади, занятой под выращиваемую культуру. Визуально оценивали по габитусу растения на ВТМ-специфичность признаков их вирусного инфицирования. Отбор осуществляли по таким типам патологических изменений: некротизация, мозаичность, сильно выраженная мозаичность, скручивание листьев.

Для идентификации вирусов использовали растения-индикаторы *Datura stramonium*, *Nicotiana glutinosa*, *Chenopodium amaranticolor* [5].

Серологический анализ изолятов проводили с помощью реакции преципитации в планшете, используя антисыворотку к штамму UI ВТМ [6].

Морфологию вирусных частиц определяли методом электронной микроскопии вирусных препаратов (электронный микроскоп ЭМВ-100БР, X 40000—70000). Вирусосодержащий материал наносили на сетки с дырчатыми пленками-подложками, изготовленными по ранее разработанным методам [7]. Для юстировки микроскопа применяли полистирольный латекс.

Чистую линию вируса, используемого для дальнейших исследований, получали в результате 5—6 пассажей через некрозообразующие (*D. stramonium*, *N. glutinosa*) и системно инфицирующиеся (*L. esculentum*, *N. tabacum*) растения-накопители механической инокуляцией сока из инфицированных растений.

Вирус выделяли в аналитических количествах, применяя ПЭГ-NaCl-осаждение [8].

Ds-Na-ПААГ-электрофорез вели по Лэмбли, используя 10 %-й гель [9].

Клеточный экстракт получали из 0,5—1 г инфицированных ВТМ листьев с последующей обработкой кислым фенолом (рН 4,0) и хлороформом. Тотальную РНК осаждали спиртом в присутствии 0,3 М KOAc (рН 5,5). Осадок промывали 70 %-м этанолом и растворяли в 200 мкл ТЕ-буфера. В реакцию обратной транскрипции брали аликвоты полученного препарата по 20—50 мкл. Перед добавлением фермента водный раствор образцов прогревали при 90 °С в течение 5—10 мин. Условия проведения реакции описаны в [1, 2]. В качестве праймеров при синтезе кДНК использовали по 0,01 мМ T1 и L1.

Праймеры для ПЦР: T1 — 5'CTACCTCAAGT-TGCAGGACC3', T2 — 5'AATCAGGCCGAACCCCA-CG3' (для С-концевого фрагмента капсидного белка TVM NT9); L1 — 5'AGATGCAGGTGCAGAGG-TCC3', L2 — 5'AGGAATAGAATAATCGAAGTAG3' (для С-концевого фрагмента капсидного белка TVM LE7).

ПЦР проводили с аликвотой (5—10 мкл) смеси из предыдущей реакции и 0,1—0,5 мМ соответ-

ствующих пар праймеров T1/T2 и L1/L2, согласно [10], по следующей программе: после денатурации кДНК в течение 5 мин при 94 °С следовали 30 циклов: 1 мин при 94 °С; 1 мин при 55 °С; 1 мин при 72 °С (прибор «Perkin-Elmer», США; *Taq*-полимераза «New England Biolabs»).

Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 2 %-м агарозном геле («Bio-Rad», США). Гель окрашивали бромистым этидием и в УФ свете (365 нм) выявляли наличие специфического фрагмента ДНК, кусочек геля с которым затем вырезали и экстрагировали из агарозы (набор «Bio 101, Inc.», США).

Секвенирование ПЦР-фрагментов ДНК и электрофорез в ПААГ осуществляли по [11]. В реакцию брали 50—100 нг ДНК, экстрагированной из агарозы, и 0,05—0,1 мМ праймеров T2 и L2, специфических к 5'-концу нуклеотидной последовательности анализируемого фрагмента.

Результаты и обсуждение. Первичный анализ различных видов растений семейства пасленовых на вирусносительство в исследованных нами регионах Украины показал, что они инфицируются вирусами различных групп, включая представителей потексвирусов (Х-вирус картофеля), карлавирусов (S- и М-вирусы картофеля), кукумовирусов (ВОМ-1), тобамовирусов (ВТМ), рабдовирусов.

В ходе эксперимента обнаружено, что во всех выборках наблюдалось комплексное инфицирование исследуемых растений, причем постоянным участником этого процесса являлся ВТМ.

В результате для дальнейших исследований отобраны изоляты ВТМ, вызывающие соответствующие симптомы и выявляющиеся в зонах с определенной радиационной нагрузкой.

Для 10 табачных изолятов из 12 выделенных образцов (с. Народици, Житомирская обл., 8—12 Ки/км) обнаружены близкие к стандартному (UI) тобамовирусному штамму морфологические характеристики вириона [12] (таблица). Два оставшихся (№№ 3, 11) по определенным параметрам соответствовали вирусу моп-топ картофеля и для дальнейших исследований не использовались [13] (см. таблицу).

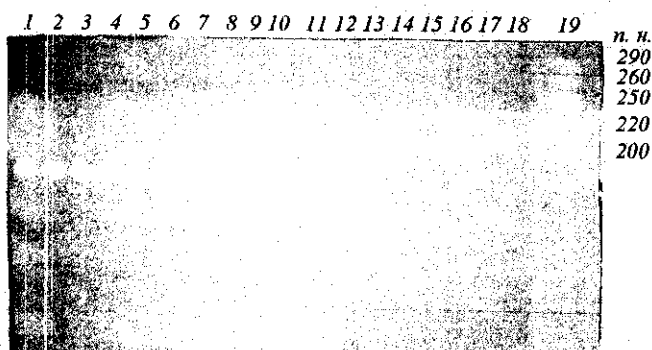
Для восьми томатных изолятов из девяти выделенных образцов (Пуша-Водица, Киевщина; 2,5 Ки/км) по результатам исследований обнаружено совпадение с характерными признаками донецкого штамма ВТМ [12] (см. таблицу). Один изолят (№ 5) обнаружил гомологию с аналогичными параметрами для вируса погремковости табака [13] (см. таблицу).

Электрофоретическая подвижность амплифицированного продукта для девяти табачных и семи

Физико-химические свойства изолятов ВТМ, отобранных в зонах с определенной радиационной нагрузкой, из *Nicotiana tabacum* (I) и *Lycopersicon esculentum* (II)

Изолят №	ТТИ (С)	E ₂₆₀ /E ₂₈₀	Белок оболочки, кДа	Размер частиц, нм
I				
1, 2, 4—10, 12	90	1,24—1,25	18,5	299—300
3, 11	75	1,45	19—20	250—300
II				
1—4, 6—9	80	1,24—1,25	18	299—300
5	80	1,35	22	190

Примечание. ТТИ — точка температурной инактивации; E₂₆₀/E₂₈₀ — соотношение показателей коэффициентов экстинкции вирусной суспензии при спектрофотометрической длине волны 260 и 280 нм.



Электрофореграмма продуктов ПЦР (электрофорез в 4 %-м ПААЛ): 1—4, 6—9 — ПЦР-продукты семи томатных изолятов (L1/L2 праймеры); 5, 10 — ПЦР-фрагмент 191 п. н. контрольной плазмиды *pTVM5.7* (L1/L2 праймеры); 11 — ПЦР-фрагмент 207 п. н. контрольной плазмиды *pTVM5.9* (T1/T2-праймеры); 12—18 — ПЦР-продукты семи табачных изолятов (T1/T2-праймеры); 19 — набор фрагментов ДНК («Pharmacia», Швеция, размеры указаны справа). Дорожки 1 и 2 — тот же образец

томатных образцов ВТМ не отличается от таковой для аналогичных фрагментов кДНК капсидного белка плазмид *pTVM5.9* и *pTVM5.7* (рисунок), служивших в качестве контроля (207 и 191 п. н. соответственно).

Секвенирование непосредственно ПЦР-фрагментов ДНК позволяет избежать долгого и трудоемкого процесса их клонирования, что необходимо при использовании других методов.

По результатам секвенирования ПЦР-продуктов девяти табачных изолятов ВТМ для восьми из них обнаружена полная гомология с последовательностью *pTVM5.9* [2]. Для одного изолята выявлена единичная нуклеотидная замена, ведущая к появлению другого триплета для той же аминокислоты в константном эпитопе [14].

Нуклеотидные последовательности ПЦР-продуктов семи томатных изолятов ВТМ идентичны последовательности *pTVM5.7* [1].

Обнаруженная замена могла возникнуть за счет ПЦР-опосредованного ошибочного включения нуклеотида. Уровень точности работы *Taq*-полимеразы — 285 «ошибок» на 10⁶ синтезируемых нуклеотидов [15]. Поскольку общая длина матрицы во всех наших экспериментах составляла 3,4 · 10⁴ п. н., то вероятность появления одиночной нуклеотидной замены достигает 97 %.

Возникновение выявленной замены за счет естественного фона мутаций лимитируется частотой, с которой ВТМ образует новые варианты, составляющей, по разным данным, 0,1—2 % [16]. Если учитывать верхний ее предел и принимать среднюю длину амплифицирующегося фрагмента, как в наших экспериментах, за 200 п. н., то выборка из каждых 50 изолятов должна выявлять один новый вариант ВТМ. Использование в ПЦР термостабильных полимераз с более низким уровнем «ошибок» синтеза, например, для «Vent(r)»-полимеразы — 57 на 10⁶ синтезируемых нуклеотидов («New England Biolabs») [17] позволит более однозначно интерпретировать полученные результаты (50 изолятов дадут матрицу общей длиной 10⁴ п. н., а это 60 % вероятности появления «ошибки» для «Vent(r)»).

Таким образом, в результате проведения скрининга вирусинфицированного материала семейства пасленовых получены данные о качественном и количественном составех представителей вирусных групп, вовлеченных в этот процесс.

В настоящей работе на основе молекулярно-биологического исследования выборки из 16 вирусных изолятов показано, что в регионах с радионуклидным загрязнением распространены штаммы ВТМ, соответствующие ранее описанным нами, — табачному TVM NT9 и томатному TVM LE7 [1, 2].

С большой степенью достоверности также показано, что в исследованных районах Украины не наблюдается повышения естественного фона мутаций для ВТМ, хотя для однозначных выводов требуются дополнительные эксперименты.

Все эти данные подтверждают целесообразность проведения подобных регулярных исследований, результаты которых могли бы быть востребованы при осуществлении экологического мониторинга различных регионов Украины.

С. А. Степанюк, О. М. Гарифуллин

Вірус потіювеної мозаїки з рослинних асоціацій різних регіонів України як природний біоіндикатор

Резюме

Проведено скринінг інфікованого матеріалу рослин родини пасльонових різних регіонів України для здійснення екологічного моніторингу. Встановлено, що рослини цієї родини інфікуються в комплексі з вірусами різних груп, причому постійним учасником коінфекції є ВТМ. Виділено 16 ізолятів ВТМ (дев'ять з тютюну, сім з томату), отриманих відповідно з с. Народичі Житомирської обл. і Пушчі-Водиці Київської обл. Проведено ПЛР-ампліфікацію одного з функціональних сайтів вірусного геному — ділянки, що кодує послідовність С-кінцевого фрагмента капсидного білка, з наступним секвенуванням специфічного продукту реакції. В результаті всі ізоляти можна віднести до раніше виділених у цих регіонах і охарактеризованих нами штамів TVM NT9 і TVM LE7. Одержані дані дозволяють зробити висновок щодо можливості використання ВТМ як моделі біологічного індикатора змін, які відбуваються в природних умовах. У свою чергу, його характеристики можуть являти собою реперні дані.

S. A. Stepanjuk, O. M. Garifulin

Biological indicator tabacum mosaic virus (TVM) from plant communities in different regions at Ukraine

Summary

The virus infected plants of Solanaceae in different regions of Ukraine (seven totally) was screened for ecological monitoring purpose. It was released that these plants usually infected at complex manner with viruses of different groups, especially TVM was constant participant of infection process [1, 2]. The 16 TVM-strains (the nine tobacco's — from Narodichi, Zhitomir region; the seven tomato's — from Pushcha-Voditsa, Kiev region)

have been studied by application RT-PCR technics. These research have not estimated virus population's distinctions on the base of changes of virus genome's functional site (coding fragment with the information about capsid protein). The all 16 strains can be classified as TVM NT9 and TVM LE7 tobacco mosaic virus strains, that have been isolated and characterized previously at the same regions [1, 2]. In accordance to these facts it can be concluded about possibility of using TVM as biological indicator model of changes which take part at the nature. In addition, these properties may be used as basic dates.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бойко А. Л., Степанюк С. А., Гарифуллин О. М. Секвенс кДНК С-концевой последовательности капсидного белка ВТМ-изолята томата из района радиологического загрязнения // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 101—106.
2. Бойко А. Л., Степанюк С. А., Гарифуллин О. М. Получение и анализ провирусной кДНК для С-концевого фрагмента капсидного белка ВТМ из изолята растений табака, произрастающих в районе радиологического загрязнения Украины // Там же.—№ 6.—С. 112—115.
3. Бойко А. Л. Экология вирусов растений.—Киев: Выща шк., 1990.—166 с.
4. Бойко А. Л. Влияние факторов внешней среды на вирусы, инфицирующие растения // С.-х. биология.—1989.—5.—С. 120—125.
5. Чумаков Н. Е. Основные методы фитопатологических исследований.—М.: Колос, 1974.—158 с.
6. Гкутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. Иммунологические методы в массовой диагностике вирусов растений.—М.: ВАСХНИЛ, 1986.—248 с.
7. Киселев Н. А. Электронная микроскопия биологических молекул.—М.: Наука, 1965.—147 с.
8. Noordam D. Identification of plant viruses. Methods and experiments / Ed. D. Noordam.—Wageningen: Pudoc., 1973.—277 p.
9. Laemmli U. K. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature.—1970.—227.—P. 680—685.
10. Ruano G., Brash D. E., Kidd K. K. PCR: the first few cycles // Amplifications.—1991.—N 7.—P. 1—4.
11. Bachmann B., Luke W., Hunsmann G. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 1309.
12. Zaitlin M., Israel H. W. Tobacco mosaic virus (type strain) // CMI/AAB. Description of Plant Viruses.—1975.—N 151.
13. Harrison B. D. Potato mop-top virus // Ibid.—1974.—N 138.
14. Радавский Ю. Л. Антигенная структура капсидных белков вирусов растений и белковых антигенов *Bortitella pertussis*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Киев, 1994.—С. 18—23.
15. Tindall K. R., Kunkel T. A. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase // Biochemistry.—1988.—27.—P. 6008—60013.
16. Губбс А., Харрисон Б. Основы вирусологии растений.—М.: Мир, 1978.—380 с.
17. Mattila P., Korpela J., Tenkanen T., Pitkanen K. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase — an extremely heat stable enzyme with proofreading activity // Nucl. Acids Res.—1991.—19.—P. 4967—4973.

Поступила в редакцию 13.10.97