



КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ВІСНИК

Доповнення до журналу
Біологія
БІОЛОГІЯ

Випуск 35

Коваленко М.О., асп., Коваленко О.Г., д-р біол. наук,
Пирог Т.П., д-р біол. наук.

АНТИФІТОВІРУСНА АКТИВНІСТЬ НАТИВНИХ ТА ДЕЗАЦИЛЬОВАНИХ ПРЕПАРАТІВ МІКРОБНОГО ЕКЗО- ПОЛІСАХАРИДУ ЕТАПОЛАНУ

Вперше встановлена антивірусна активність полісахаридних препаратів, синтезованих Acinetobacter sp. 12S на різних вуглецевих субстратах. Нативні та дезацильовані екзополісахариди пригнічували інфекційність вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ) на дурмані, а також Х-вірусу картоплі на гомфрені. Випробувані препарати виявилися активними індукторами стійкості рослин тютюну до інфекції ВТМ.

For the first time the antiviral activity of the polysaccharide preparations synthesized by Acinetobacter sp. 12S on the different carbon substrates was demonstrated. Native and deacylated exopolysaccharides inhibited infection of tobacco mosaic virus (TMV) on the Datura stramonium and potato virus X on the Gomphrena globosa. The testing preparations were active inducers of tobacco plants resistance to TMV infection.

Раніше було показано, що аніонні полісахариди, зокрема природний гетерополісахарид Trihotecium roseum [10], а також сульфатовані дріжджові манани [12], на відміну від нейтральних полісахаридів [2, 11], можуть індукувати у надчутливих рослин стійкість до вірусної інфекції de novo. Ці властивості полісахаридів уможливають моделювання у рослин стану індукованої резистентності з метою вивчення механізмів її виникнення та функціонування.

У складі комплексного полісахаридного препарату етаполану, який продукується Acinetobacter sp. 12S в різних умовах культивування, виявлено значну кількість глюкуронової кислоти [7].

У зв'язку з цим цікаво було дослідити, чи здатні препарати етаполану пригнічувати вірусну інфекцію та викликати у рослинній тканині вірусостійкість, тим паче, що у процесі розвитку останньої у рослин тютюну виявлено підвищення вмісту уронових кислот (УК) та поліуронідів [3].

Матеріали та методи. Об'єкти досліджень. Об'єктом досліджень був штам Acinetobacter sp. 12S та синтезований ним комплексний полісахаридний препарат етаполан [7]. Об'єктами досліджень також були вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), звичайний штам (U1) та місцевий штам Х-вірусу картоплі (ХВК).

Культивування Acinetobacter sp. 12S. Бактерії ви-

© Коваленко М.О., Коваленко О.Г., Пирог Т.П., 2001

Таблиця 1. Хімічний склад нативного та дезацильованого етаполану, синтезованого на різних джерелах вуглецевого живлення

Джерело вуглецевого живлення	Індекс препарату	Вміст в ЕПС, % до маси умовно сухої речовини								
		Нативний ЕПС					Дезацильований ЕПС			
		Вуглеводи	ПВК	УК	ЖК	МК	Вуглеводи	ПВК	УК	МК
Етанол + глюкоза	1	34,5±0,5	3,6±0,2	6,7±0,2	9,4±0,1	20,3±0,4	60,0±0,4	4,3±0,2	22,2±0,1	3,5±0,2
Глюкоза	2	34,0±0,5	3,8±0,2	8,0±0,2	6,4±0,2	19,4±0,4	56,0±0,5	4,9±0,1	25,5±0,5	3,3±0,2
Етанол	3	34,2±0,5	3,7±0,2	7,7±0,2	6,8±0,2	22,6±0,1	59,1±0,5	4,4±0,2	22,0±0,2	3,9±0,2

Примітка. ПВК - пірвіноградна кислота, УК - уронові кислоти, ЖК - жирні кислоти, МК - мінеральні компоненти.

рощували в колбах на качалці (220 об/хв) при 30 °С, рН 6,8–7,0 впродовж 96 год. на рідкому мінеральному середовищі Кодама [6], в яке додатково вносили 0,5% (за об'ємом) дріжджового автолізу та 0,0006% пантотенату кальцію. Як джерело вуглецю та енергії використовували етанол в концентрації 1,0% (за об'ємом), глюкозу в концентрації 1,0% (масовий), а також суміш цих субстратів у співвідношенні 1:1 (0,5% глюкози та 0,5% етанолу).

Хімічний склад етаполану. Виділення нативного та дезацильованого етаполану, визначення у складі ЕПС вмісту вуглеводів, пірвіноградної кислоти (ПВК), уронових кислот (УК), жирних кислот (ЖК) та мінеральних компонентів (МК) проводили, як описано в роботі [7].

Визначення антивірусної активності препаратів етаполану. Очищені препарати вірусів отримували ме-

тодом диференційного центрифугування, як описано в роботі [5]. Антивірусну активність водних розчинів полісахариду в концентрації 10, 100 та 1000 мкг/мл досліджували додаючи їх до суспензії очищеного вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ, 2 мкг/мл) або Х-вірусу картоплі (ХВК, 10 мкг/мл) та інокуючи сумішами листя дурману (*Datura stramonium* L.) та гомфрени (*Gomphrena globosa* L.). Здатність полісахаридних препаратів індукувати у рослин стійкість щодо ВТМ-інфекції вивчали, ін'єкуючи водні розчини полісахариду (100, 500, 1000 та 2000 мкг/мл) в міжклітинний простір половинок листків надчутливого до ВТМ сорту тютюну (*Nicotiana tabacum* L.) Імунний 580, N. Sanderae Hort та дурману за допомогою "інсулінового" шприца. В протилежні контрольні половинки листків в такий же спосіб вводили воду. Через 2 доби праву і

Таблиця 2. Антивірусна активність дезацильованих препаратів етаполану в різних системах вірус-рослина-хазяїн

Тест-система	Індекс препарату	Концентрація, мкг/мл	Кількість локальних некрозів/лист		% від контролю
			у досліді	у контролі	
ВТМ-дурман	1	1000	34	114	29,8 ± 9,2
		100	78	122	63,9 ± 9,6
		10	64	91	70,3 ± 9,6
	2	1000	59	149	39,6 ± 6,4
		100	102	150	68,0 ± 8,3
		10	91	163	55,8 ± 7,5
	3	1000	31	92	33,7 ± 8,5
		100	78	106	73,6 ± 12,2
		10	49	79	62,0 ± 16,2
ВТМ-гомфрена	1	1000	5	55	9,1 ± 8,9
		100	29	63	46,0 ± 5,8
		10	47	20	236,0 ± 56,8
	2	1000	25	79	31,6 ± 7,4
		100	39	58	67,2 ± 10,3
		10	52	57	91,2 ± 17,3
	3	1000	9	69	13,4 ± 3,6
		100	25	30	83,3 ± 10,7
		10	62	55	112,7 ± 13,8
ХВК-гомфрена	1	1000	8	57	14,0 ± 4,2
	2	1000	11	69	15,9 ± 6,7
	3	1000	14	81	17,3 ± 9,7

Примітка. Індеси препаратів - див. табл.1.

ліву половинки інокулювали очищеним препаратом ВТМ (1 мкг/мл). Ступінь пригнічення вірусної інфекції досліджуваними препаратами оцінювали за кількістю локальних некрозів на дослідній і контрольній половинках листа. Результати дослідів піддавали біометрії, як і раніше [2, 10].

Результати та обговорення. Хімічний склад нативного та дезацильованого етаполану, синтезованого на середовищі з різними джерелами вуглецевого живлення, наведено у табл. 1. Незалежно від природи субстрату, нативні ЕПС характеризувались практично однаковим вмістом у їх складі вуглеводів, ПВК, УК та мінеральних компонентів. Етаполан, синтезований на суміші етанолу та глюкози, містив більшу кількість жирних кислот. Вміст уронових кислот у складі всіх нативних ЕПС був невисоким і становив всього 7–8%. Попередніми дослідженнями було показано, що уронові кислоти в нативних ЕПС вдається виявити тільки після дезацильовання полісахаридів [8]. Дійсно, у складі дезацильованих ЕПС вміст УК був приблизно у три рази вищим, ніж в аналогічних препаратах до дезацильовання (табл. 1). Після дезацильовання у складі ЕПС підвищився також вміст вуглеводів та суттєво знизився вміст МК (більше, як у 5 разів).

На нашу думку, це явище можна пояснити наступним чином. Наявність жирних кислот у складі етаполану обумовлює здатність його розчинів до структурування одновалентними катіонами (K^+ , Na^+), які містяться в середовищі культивування продуцента [7]. Так, у складі нативних ЕПС виявлено близько 20% мінеральних компонентів (табл. 1). Цілком ймовірно, що при взаємодії ЕПС з катіонами молекули полісахариду змінюють свою конформацію так, що уронові кислоти стають менш доступними для взаємодії з різними реагентами. Очевидно, при дезацильованні спостерігається дисоціація таких високомолекулярних конгломератів ЕПС, внаслідок чого вивільнюються мінеральні компоненти, просторова структура ЕПС змінюється, "заблокованість" залишків уронових кислот знімається. Аналогічним чином можна пояснити і більш високий вміст вуглеводів у складі дезацильованих ЕПС.

Випробування біологічної (антивірусної) активності полісахаридів показало, що дезацильовані пре-

парати в концентрації 10–1000 мкг/мл здатні інгібувати інфекційність вірусів рослин — ВТМ та ХВК (табл. 2). Статистично достовірної різниці в активності препаратів щодо вірусів нами не виявлено, хоча впадає в око тенденція "зниження" активності дезацильованого препарату, одержаного на глюкозі (при підвищеній його концентрації) у порівнянні з препаратами, синтезованими на етанолі та суміші субстратів.

Щоб остаточно переконатись, чи впливає природа джерела вуглецю, на біологічну активність ЕПС, нами було досліджено здатність нативних препаратів та їх дезацильованих похідних пригнічувати ВТМ. У результаті було встановлено (табл. 3), що природа вуглецевого джерела живлення суттєво не впливає на інгібіторну активність етаполану. Проте можна помітити, що нативні препарати більш активно пригнічували інфекційність ВТМ, ніж їх дезацильовані похідні. Співставляючи ці спостереження із результатами визначення вмісту глюкуронової кислоти у полімерах (див. табл. 1), неважко зробити висновок, що просторова "доступність" цього компонента для вірусу чи рослини не грає визначної ролі в антиінфекційній дієвості полімера. Навпаки, нативні препарати ЕПС, в яких уроновий компонент, очевидно, заблоковано, у підвищених концентраціях (100–1000 мкг/мл), виявилися більш активними інгібіторами інфекційності вірусу. Цей висновок узгоджується з положенням про те, що нейтральні полісахариди, на відміну від аніонних, виявляються більш активними "інгібіторами інфекцій" [2, 11]. Проте, останні, подібно Т–полі [10] та сульфатованим мананам [12] можуть мати властивості "істинних" індукторів резистентності рослин та вірусів.

У зв'язку з цим наступними дослідженнями ми мали на меті перевірити, чи здатні досліджувані нами поліуроніди викликати у рослин стан стійкості до вірусної інфекції. Досліди показали, що нативні препарати етаполану, введені у міжклітинний простір рослин тютюну, дурману та *N. Sanderæ* у концентрації 100–500 мкг/мл, за деякими винятками, не індукували стійкості рослин до наступної інокуляції ВТМ. Лише у концентрації 1–2 мг/мл досліджувані ЕПС проявили індукуючі властивості як на тютюні, так і на дурмані. За своєю активністю та характером дії вони є близькими до інших аніонних полісахаридів [10, 11], але

Таблиця 3. Порівняльна активність щодо інфекційності ВТМ на дурмані у нативних та дезацильованих препаратах етаполану

Індекс препарату	Концентрація, мкг/мл	Зниження кількості локальних некрозів на листі дурману, %	
		нативним препаратом	дезацильованим препаратом
1	1000	81,2 ± 5,4	70,2 ± 9,2
	100	46,7 ± 10,1	36,1 ± 9,5
	10	27,3 ± 17,1	29,7 ± 9,6
2	1000	75,0 ± 7,2	60,4 ± 6,4
	100	64,8 ± 11,1	32,0 ± 8,3
	10	44,5 ± 7,9	44,2 ± 7,5
3	1000	81,2 ± 3,1	66,3 ± 8,5
	100	67,6 ± 6,7	26,4 ± 12,2
	10	12,0 ± 9,7	38,0 ± 16,2

Примітка. Індеси препаратів - див. табл.1.

відрізняються від індукторів типу дволанцюгових РНК [1, 9] та полірибонуклеотидних комплексів [4, 13].

Подальші дослідження у цьому напрямку дадуть змогу вивчити механізм, за допомогою якого поліуроніди проявляють свої індукуючі властивості, а також визначити придатність цих полімерів для захисту рослин, тварин і людей від шкодочинності вірусних інфекцій.

1. Бобырь А.Д., Садовский Ю.П., Коваленко А.Г. Индукция локальной и системной устойчивости табака к вирусу табачной мозаики с помощью вируса и РНК вируса, поражающего *Penicillium funiculosum* // Биол. Науки. — 1974. — N 10. — С. 99–105. 2. Коваленко А.Г. Белок-углеводное взаимодействие в реализации устойчивости растений к вирусам // Микробиол. журн. — 1993. — 55, N 6. — С. 76–91. 3. Коваленко О.Г., Кириченко А.М., Телегеева Т.А. Вміст уронідов та уронідів у сприйнятливих і стійких рослинах тютюну, уражених вірусом тютюнової мозаїки // Біоресурси та віруси. Тез. доп. конф. (11–15 вересня 2001, Київ). Київ: Фітосоціоцентр. 2001. — С. 77. 4. Коваленко А.Г., Щербатенко И.С., Коган Э.М. и др. Индукция устойчивости растений к вирусу табачной мозаики двунитевым комплексом поли(Г)-поли(Ц) // Вопр. Вирусол. — 1980. — №3. — С. 364–368. 5. Коваленко А.Г., Щербатенко И.С., Олещенко Л.Т. Инфицирование протопластов мезофилла картофеля вирусом табачной мозаики // Биол. науки. — 1985. — №2. — С. 42–47. 6. Кодама Т., Накахара Т., Омори Т. и др. Образование внеклеточных полисахаридов водородными и метаниспользующими микроорганизмами // Рост микроорганизмов на C1-соединениях: Тез. докл. симп. (12–16 сентября 1977, г. Пущино). Пущино: НЦБИ АН СССР. — 1977. — С. 213–215. 7. Пирог Т.П. Принципи регуляції складу і фізико-хімічних властивостей екзополісахаридів, синтезованих *Acinetobacter* sp.: Дис... докт. біол. наук. Київ, Інститут мікробіології і вірусології НАН України, 1999. — 450 с. 8. Пирог Т.П., Краснопецева Н.В., Гринберг Т.А. и др. Изменение некоторых свойств экзополисахаридов *Acinetobacter* sp. в процессе периодического культивирования // Биотехнология. — 1991. — N 4. — С. 67–70. 9. George C.X., Gupta B.M., Paul Khurana S.M., Nagaich B.B. Antiviral activity in plants of a mycoviral double — stranded RNA from *Trichothecium roseum* // Acta. Virol. — 1981. — №6. — P. 408–414. 10. Gupta B.M., Chandra K., Verma H.N., Verma C.S. Induction of antiviral resistance in *Nicotina glauca* plants by treatment with *Trichothecium polysaccharide* and its reversal by actinomycin D // J. Gen. Virol. — 1974. — 24, №2. — P. 211–213. 11. Kovalenko A.G. Antivirale Eigenschaften mikrobieller Polysaccharide — ein Überblick // Zbl. Mikrobiol. — 1987. — 142, №3. — S. 301–310. 12. Kovalenko A.G., Grabina T.D., Kolesnik L. V. et al. Virus resistance induced with mannan sulphates in hypersensitive host plants // J. Phytopath. — 1993. — 137, №2. — P. 133–147. 13. Stein A., Leobenstein G. Induction of resistance to tobacco mosaic virus by poly-I-poly-C in plants // Nature. — 1970. — 226, №5243. — P. 363–364.

УДК 582.232

Самойленко В.А., асп., Сирчін С.О., канд. біол. наук,
Цимбал Н.В., асп., Менджул М.І., д-р. біол. наук