

Взаємне зближення доменів I та II призводить до зменшення щільності між доменами, тобто, фактично між залишками Arg69-Leu77 та His295-Gly305, що знаходяться по краях щільності з боку доменів I та II. Мінімальна відстань між залишками Arg69-Leu77 і His295-Gly305 для траєкторій 1, 2 та 4 зменшується до суми ван-дер-ваальсових радіусів на 9000, 6700 та 1900пс, відповідно. При цьому різко збільшується кількість міжатомних контактів між Arg69-Leu77 та His295-Gly305 практично від нуля до 100-400. Таким чином утворюється повністю закрита конформація eEF1A2 без щільності між доменами I і II (рис. 1б). Слід зазначити, що перехід у закриту конформацію є оборотним, і білок може повернутися назад у відкриту конформацію. Так, eEF1A2 на траєкторії 2 вперше переходить у закриту конформацію на 1060пс, після чого знов переходить у відкриту конформацію і остаточно переходить у закриту форму на 6700 пс. На траєкторіях 3 та 7 eEF1A2 існує у закритій конформації лише короткі проміжки часу 6350-6650 та 7500-7900пс, відповідно. На траєкторії 4 перший перехід у закриту конформацію спостерігається на 1300пс, на 1765пс білок повертається у відкриту форму, на 1900пс знов переходить у закриту і ще раз намагається повернутися у відкриту конформацію на 6584пс.

Раніше було встановлено методом малокутового розсіювання нейтронів, що молекула eEF1A1 стає більш компактною у присутності тРНК [7]. Можна припустити, що аналогічним чином більш компактна закрита конформація eEF1A2 стабілізується своїми біологічними лігандами.

З рис. 1в видно, що найбільші значення середньоквадратичних флуктуацій α -атомів характеризують домен I, найменші – домен III. Це пов'язано з різним розміром доменів: чим більше домен, тим більші значення середньоквадратичних флуктуацій. Амінокислотні залишки з середньоквадратичними флуктуаціями α -атомів більше 0,14нм в домені I, більше 0,11 нм в домені II та більше 0,09нм в домені III, показані на рис. 1 г. Як видно з рисунку, в домені I найбільшими величинами середньоквадратичних флуктуацій (більше 0,14нм) характеризуються амінокислотні залишки у неупорядкованих ділянках (Gly2-Glu4, Gly33, Met49-M3155, Arg69-Ile75, Ser157-Pro161, Pro207-Asn207), на кінці β -шпильки Trp214-Gly225 (Lys219-Gly221) та деякі залишки на α -спіралях (Lys36-Arg37, Lys44-Glu48, Ala65, Arg67-Glu68, Gly121). Слід підкреслити, що залишки Gly33, Lys36-Arg37, Lys44-M3155, Ala65, Arg67-Ile75 знаходяться на рухливій ділянці Cys31-Leu77, яка складається з трьох петель Cys31-Asp35, Met49-Tyr56, Arg69-Leu77 та двох α -спіралей Lys36-Glu48, Ala57-Glu68. Ця ділянка знаходиться з іншого боку щільності відносно домену II та здатна рухатися як єдине ціле. Значною мірою зменшення і закриття щільності між доме-

нами I і II здійснюється саме завдяки рухам ділянки Cys31-Leu77. В домені II найбільші середньоквадратичні флуктуації (>0,11нм) характерні для залишків Ile256-Gly260 та His295-Ala298, які знаходяться на кінцях β -шпильок Asp252-Val264 та Val292-Leu299, а також для Lys318-Asp319 та Arg321 у неупорядкованому ланцюзі Lys313-Gly323. Найбільшу рухливість у третьому домені (середньоквадратичні флуктуації більше 0,09нм) показують залишки Thr365, Arg381-Leu387, Asp389, Met429-Arg430, що знаходяться в β -шпильках Tyr357-Phe373, Leu375-Gly390, Gly422-Val437, а також залишки Gln335, Pro350-Gln352, Lys408, Ser416-Gln417 в неупорядкованих ділянках та Gly407, Lys443 на кінцях β -тяжів.

Висновки. В даній роботі побудована тривимірна модель другої ізоформи фактору елонгації трансляції 1А людини. Методом моделювання молекулярної динаміки в інтервалі 10нс досліджена конформаційна рухливість eEF1A2. Одержано сім траєкторій з різними початковими швидкостями атомів. Показано, що взаємне зближення доменів I та II може призводити до закриття щільності між цими доменами та утворення нової закритої конформації, при цьому перехід у закриту конформацію є оборотним. Подібні зміни конформації можуть брати участь у виявленні для першої ізоформи фактору елонгації компактизації при зв'язуванні з тРНК [7]. Описані найбільш рухливі амінокислотні залишки в кожному з структурних доменів eEF1A2.

Основна частина моделювання молекулярної динаміки проводилася на обчислювальному кластері Київського національного університету імені Тараса Шевченка (www.cluster.univ.kiev.ua). Автори вдячні канд.фіз.-мат.наук О.О. Судакову (радіофізичний факультет Київського національного університету імені Тараса Шевченка) за технічну підтримку у проведенні розрахунків.

1. Negrutskii B.S., El'skaya A.V. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling // Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. – 1998. – V. 60. – P. 47–78.
2. Kahns S., Lund A., Kristensen P. et al. The elongation factor 1 A-2 isoform from rabbit: cloning of the cDNA and characterization of the protein // Nucleic Acids Res. – 1998. – V. 26, N 8. – P. 1884–1890.
3. Andersen G.R., Pedersen L. Valente L. et al. Structural Basis for Nucleotide Exchange and Competition with tRNA in the Yeast Elongation Factor Complex Eef1A-Eef1B // Mol. Cell. – 2000. – V. 6. – P. 1261.
4. Andersen G.R., Valente L., Pedersen L. et al. Crystal Structures of Nucleotide Exchange Intermediates in the Eef1A-Eef1Balpha Complex // Nat. Struct. Biol. – 2001. – V. 8. – N 6. – P. 531–534.
5. Vitagliano L., Masullo M., Sica F. et al. The Crystal Structure of Sulfolobus Solfataricus Elongation Factor 1 Alpha in Complex with Gdp Reveals Novel Features in Nucleotide Binding and Exchange // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 5305.
6. Каниболоцкий Д.С., Новосильная А.В., Негруцкий Б.С., Ельская А.В. Конформационная подвижность фактора элонгации трансляции eEF1A1 человека // Биополимеры и клетка. – 2007. – Т 23, № 4. – с. 307–317.
7. Budkevich T.V., Timchenko A.A., Tiktopulo E.I. et al. Extended conformation of mammalian translation elongation factor 1A in solution // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – N 51. – P. 15342–15349.

Надійшла до редколегії 05.02.07

УДК 578.3

А. Коренєва, асп.,
Л. Міщенко, д-р біол. наук

ЕЛЕКТРОННО-МІКРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗБУДНИКІВ ВІРУСНИХ ХВОРОБ PANAX GINSENG C.A. MEYER

Проведено моніторинг культурних фітоценозів *Panax ginseng* C.A. Mey. Виділено вірус із насіння та плодів хворих рослин женьшеню. За допомогою методу електронної мікроскопії встановлені форма та розміри вірусних часток.

Monitoring of cultural phytocenoses of *Panax ginseng* C.A. Mey. is carried out. Virus from the seeds and fruits of infected ginseng plants is isolated. The form and length of particles were established with electron microscopy method.

Вступ. Третина лікувальних засобів, що використовуються у сучасній медицині, виготовляється з лікарсь-

ких рослин. Природні сполуки з рослин також застосовуються в харчовій, парфумерній та інших галузях [5].

© Коренєва А., Міщенко Л., 2007

Виключна цінність сировини лікарських рослин вимагає посиленої уваги до їх вирощування.

Рідкісною та надзвичайно цінною лікарською рослиною є женьшень (*Panax ginseng* С.А.Мей.). За лікувальною дією препарати з женьшеню відносять до загальнозміцнюючих, адаптогенних, стимулюючих і тонізуючих засобів, що мають широку терапевтичну дію [1]. Оскільки в природних умовах ареал поширення цих рослин дуже обмежений, для задоволення потреб фармакологічної галузі існує постійна необхідність вирощування женьшеню в культурі. Складність культивування женьшеню пов'язана з вимогами цієї рослини до умов вирощування. На відміну від природних фітоценозів, при інтродукуванні, пристосовуючись до нових кліматичних умов, женьшень стає виснаженим і більш чутливим до фітопатогенів різної природи [6]. На культурних плантаціях женьшеню відмічені грибні, бактеріальні та вірусні хвороби [2, 4, 8, 9, 11].

В умовах промислового вирощування найбільш розповсюджені грибні захворювання женьшеню. Так, в Україні були відмічені фітофтороз, фузаріоз, антрактос та несправжня борошниста роса [11]. Серед бактеріальних хвороб – бактеріальне захворювання листків женьшеню [9], червона, мокра і янтарна гнилі коренів [8].

На сьогоднішній день в Україні існують лише поодинокі повідомлення про вірусні захворювання лікарських рослин. Зазначено, що віруси, у значній мірі впливаючи на стан рослин, приносять господарські збитки та знижують фармакологічну якість сировини [12].

Потрібно відмітити, що широкомасштабних обстежень плантацій женьшеню в Україні на наявність вірусних захворювань не проводилось.

Тому метою наших досліджень було проведення моніторингу культурних фітоценозів женьшеню на наявність вірусної інфекції.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом досліджень слугували уражені рослини *Panax ginseng* С.А. Мей. сорту Український – 2. Зразки уражених органів рослин женьшеню відбирали на плантаціях дослідної станції Боярського лісового господарства Київської області. Методом візуального обстеження були виявлені рослини з характерними симптомами, з яких відбирали зразки листків, насіння та плодів. Для досліджень брали рослини різного віку (1-5-річні) з симптомами ураження.

Виділення вірусів зі зразків проводили згідно методики Brakke [14] у нашій модифікації [7]. Гомогенізували листки, плоди та насіння женьшеню у 10 mM буферному розчині, що містить K_2HPO_4 pH 6,1, у співвідно-

шенні 1:2 з подальшим низькошвидкісним центрифугуванням у режимі 5 тис. об/хв протягом 30 хвилин на центрифугі K-23. pH надосаду доводили до показника 7,5–8,0 за допомогою 1 M NaOH, змішували з 10 mM лимоннокислим натрієм у співвідношенні 1:1. Для розбивання осаду до суміші протягом 30 хвилин на магнітній мішалці додавали 1% від загального об'єму екстракту тритон X-100. У подальшому проводили високошвидкісне центрифугування у режимі 27 тис. об/хв протягом 1,8 години при 5°C на ультрацентрифугі Beckman L5 – 50B. Далі осад ресуспендували в 10 mM лимоннокислому натрію pH 8,0 та залишали на ніч на магнітній мішалці при 4°C. Наступний режим центрифугування становив 5 тис. об/хв протягом 5 хв з подальшим високошвидкісним центрифугуванням у режимі 25 тис. об/хв протягом 3 год через 20%-ву цукрозну подушку. Утворений осад ресуспендували в 10 mM лимоннокислому натрію pH 8,0 та ставили на ніч на магнітну мішалку. Проводили центрифугування у режимі 5 тис. об/хв протягом 5 хв. Вірусомісний матеріал в кількості 2 мл нашаровували на лінійний градієнт цукрози (10–40%), приготований на 10 mM лимоннокислому натрію pH 8,0 та центрифугували у режимі 27 тис. об/хв протягом 3 год. Далі осад ресуспендували в 10 mM лимоннокислому натрію pH 8,0 та залишали на ніч на магнітну мішалку [7, 14].

Препарати для електронної мікроскопії готували за методом негативного контрастування. Для фіксації вірусних суспензій використовували 2% розчин фосфоровольфрамової кислоти в дистильованій воді pH=7,4. Вірусомісний матеріал наносили на сіточки та витримували 2–3 хв [10]. Препарати досліджували за допомогою електронних мікроскопів Jeol Jem 1230 (Японія) та EM-125 (Суми, Україна).

Результати та їх обговорення. При обстеженні плантацій женьшеню ми спостерігали наступні симптоми захворювання: чітко виражену прижилкову хлоротичну мозаїку, помітне звуження листової пластинки, в окремих випадках – затримку росту рослин.

В результаті електронно-мікроскопічних досліджень очищених препаратів різних органів рослин женьшеню нами були виявлені патогени вірусної природи. Серед відібраних нами досліджуваних органів рослин, вірус був знайдений у насінні та плодах. З насіння 4-х річних рослин виділені паличкоподібні структури розміром $460 \pm 20 \times 11,8$ нм. З плодів рослин 4-х річного віку – нитковидні віріони розміром $1150 \pm 20 \times 11,5$ нм (рис. 1).

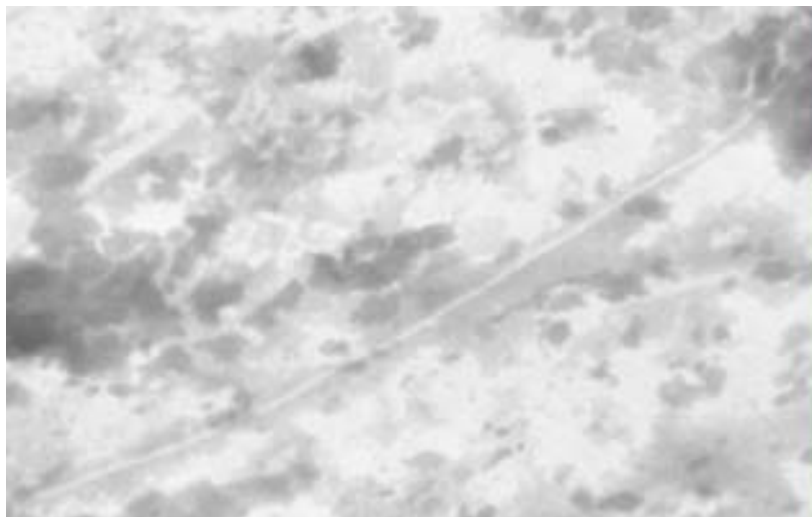


Рис. 1. Електронограма вірусу, виявленого в плодах 4-х річних рослин *Panax ginseng* С.А. Мей. (інструментальне збільшення, $\times 60\,000$)

Відомо, що в природі *Panax ginseng* С.А. Мей. розмножується виключно насінням [3]. У заражених рослин знижується насіннєва продуктивність, що призводить до погіршення якості розсади та зменшення маси коренів порівняно зі здоровими рослинами [13]. Крім того, таке насіння з хворих рослин гірше зберігається і характеризується меншою стійкістю до грибних захворювань. За літературними даними, зі збільшенням віку женьшеню кількість хворих рослин підвищується [13]. Зокрема, відмічено, що захворювання найбільше розповсюджене на плантаціях 4-річних рослин. Проведені нами дослідження методом електронної мікроскопії також дозволили виявити вірусоподібні частки у рослинах саме цього віку. Це може мати негативні наслідки, так як на цьому етапі розвитку рослини починають інтенсивно набирати масу коренів. Отже, віруси можуть погіршувати фармацевтичні властивості лікарської сировини, тому їх дослідження має велике практичне значення.

Висновки. В результаті проведення фітопатологічного моніторингу плантацій женьшеню справжнього (*Panax ginseng* С.А. Мей.) сорту Український – 2 були виявлені рослини з симптомами прижилкової хлоротичної мозаїки та звуження листової пластинки. З насіння хворих рослин виділено паличкоподібний вірус розмірами $460 \pm 20 \times 11,8$ нм та з плодів – нитковидний розмірами $1150 \pm 20 \times 11,5$ нм, які виявлені методом електронної мікроскопії.

УДК.631.11.324:661.63

1. Бабич А.М. Женьшень обыкновенный / В кн. Лекарственные растения: вековой опыт изучения и возделывания – Полтава: Верстка, 2004. – С. 76–77.
2. Бидай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г. и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений. – Киев: Наук. думка, 1988. – 432 с.
3. Голубева В.С., Дишук Н.Г., Кобзарова В.С. Патогенная микобиота семян женьшеня. – Защита растений, Сб. Научных трудов. – Минск, 2005. – Вып. 30. – ч. 1. – С. 202–204.
4. Коренева А.А., Мищенко Л.Т. Виявлення вірусної інфекції в рослин женьшеню // Екологія: Проблеми адаптивно-ландшафтного землеробства. – Івано-Франківськ, 2006. – С. 213–215.
5. Куценко Н.І. Особливості селекційно-насінницької роботи з малотонажними лікарськими культурами в сучасних умовах // Наук. праці Полтав. держ. аграр. академії. С/г науки. – 2002. – № 1. – С. 66–70.
6. Малышев А.А. Женьшень: Биология и разведение. – М.: Агропромиздат., 1986. – 141 с.
7. Мищенко Л.Т., Бойко А.Л. Вірус смугастої мозаїки пшениці в Україні // Доповіді Національної академії наук України. – 2004. – № 2. – С. 176–180.
8. Мураш В.А., Житкевич Н.В., Жук Е.Г. Бактериальные болезни женьшеня на Украине // Микробиол. журн. – 1994. – 56, № 1. – С. 84–85.
9. Огородник Л.С., Гвоздяк Р.І., Яковлева Л.М. Видовий склад збудників бактеріозів женьшеня в Україні і Білорусі // Вісн. Одес. нац. ун-ту. – 2005. – том 10, № 7. – С. 284–286.
10. Салига Ю.Т., Снітинський В.В. Електронна мікроскопія біологічних об'єктів. – Львів. – 1999. – 152 с.
11. Скребнева Т.М. Женьшень на Украине. – Киев, 1977. – С. 47–56.
12. Хотин Ю.А. Вирусные болезни лекарственных растений семейства пасленовых. Автореф. дис...канд. биол. наук. – М., 1974.
13. Чужан А.Х., Крылов А.В. Влияние некротической мозаики на продуктивность женьшеня *Panax ginseng* С.А. Мей / В кн. Вирусные болезни растений Дальнего Востока. Труды БПИ ДВ НЦ АН СССР, 1976. – т. 25/128. – С. 279–281.
14. Brakke M.R., Shopp R.N. and Lanc L.C. Degradation of Wheat Streak Mosaic Virus Capsid Protein During Leaf Senescence. Phytopathology, 1990. – Vol. 80, № 12. – P. 1401–1405.

Надійшла до редколегії 25.09.06

О. Біда, асп., О. Серга, канд. біол. наук,
Т. Паршикова, д-р біол. наук

ОЦІНКА ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ СОРТІВ ПШЕНИЦІ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) ЗАЛЕЖНО ВІД РІВНЯ ФОСФОРНОГО ЖИВЛЕННЯ

В лабораторних умовах проведено скринінг сортів чутливих до обмежень в мінеральному живленні. Показано, що у рослин в умовах дефіциту фосфору підвищується рівень накопичення МДА, також відмічено пригнічення біосинтезу хлорофілу.

Screening of sorts sensitive to limit of the mineral nutrition was made in lab conditions. The level of MDA decreased in plants during phosphorus deficiency and inhibition of chlorophyll biosynthesis was noticed.

Вступ. Загальновідомо [1], що необхідність достатньої кількості фосфору для рослин тісно пов'язана з енергетичним обміном, ферментативним каталізом, проникністю клітинних мембран та іншими важливими функціями організму. Як відомо, у більшості ґрунтів, особливо піщаних, фосфор присутній в незначній кількості: загальний його вміст коливається в межах 500–800 мг/кг сухого ґрунту. На органічні сполуки фосфору в ґрунтах припадає від 10–20 до 70–80% всіх його запасів, однак для рослин органічний фосфор стає доступним лише після мінералізації ґрунтовими мікроорганізмами, які відщеплюють неорганічний фосфор за допомогою ферменту фосфатази.

Рослини поглинають тільки розчинний фосфор в у формі ортофосфату (H_2PO_4^- або HPO_4^{2-}). Вирішальну роль у доступності фосфору для рослин відіграє рН ґрунтів [2]. Так, у кислих ґрунтах (рН нижче 6,8) присутні водорозчинні легкодоступні солі фосфатного аніону H_2PO_4^- і одновалентних катіонів K^+ , Na^+ , NH_4^+ , а також однозаміщений ортофосфат кальцію $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$, розчинний у воді й легко доступний рослинам. У ґрунтах із рН в межах 6,8–7,2 переважає фосфор у менш доступній формі HPO_4^{2-} , його солі з двохвалентними катіонами, наприклад із кальцієм, розчиняються

під дією кислот, й лише після цього можуть бути використані рослинами.

У лужних ґрунтах із рН вищим 7,2 переважають трьох заміщені фосфати дво- і тривалентних катіонів, наприклад, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, практично нерозчинні у воді й тому недоступні рослинам.

На Україні в ґрунтах сільськогосподарського призначення спостерігається дефіцит доступних форм фосфору [2]. В зв'язку з цим при невисоких дозах внесення фосфору (менше 12–15 кг P_2O_5 на 1 га посівів) у багатьох районах спостерігається зниження ефективності використання й азотних та калійних добрив. Отже, використання збалансованих за складом мінеральних добрив стає досить дієвим засобом впливу як на хімічні, фізичні, біологічні властивості ґрунту, так і на живлення рослин, їхній ріст і розвиток, стійкість до несприятливих умов довкілля, а також урожай та його якість. Одним з перспективних шляхів вирішення цього питання може бути впровадження в сільське господарство нових, більш витривалих та стійких до обмежень в кількості елементів мінерального живлення сортів пшениці.

Метою даної роботи була оцінка чутливості процесів росту та розвитку нових сортів пшениці, запропонованих для сільськогосподарства, до різних рівней за-