

МИКОВИРУС В КЛЕТКАХ ПАТОГЕННОГО ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ГРИБА *FUSARIUM JAVANICUM* *VAR. RADICICOLA* WR.

Журавлева Н.П. (вед.н.с.)¹, Елинов Н.П. (зам. директора по НИР)¹, Васильева Н.В. (директор)¹, Семенов В.В. (вед.н.с.)¹, Сироткин А.К. (вед.н.с.)², Давыденко С.Г. (ст.н.с.)³

¹НИИ медицинской микологии им. П.Н.Кашкина ГОУ ДПО СПб МАПО, ²НИИ гриппа РАМН, ³Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
© Коллектив авторов, 2008

Нами обнаружен литический эндофактор в клетках патогенного для человека гриба *Fusarium javanicum* var. *radicicola*, способный к репродукции и названный нами миковирусом. Работа зарегистрирована как научное открытие (диплом №326) с приоритетом 01 июля 1999 г.

Ключевые слова: аллергены, вирусы грибов, миковирус *Fusarium javanicum* var. *radicicola*, патогенный для человека, ридостин, статолон

MYCOVIRUS IN CELLS OF PATHOGENIC FOR MAN *FUSARIUM* *JAVANICUM* VAR. *RADICICOLA* WR.

Jhuravleva N.P. (leading researcher)¹, Yelinov N.P. (deputy director for Research Program)¹, Vasilyeva N.V. (director)¹, Semenov V.V. (leading research worker)¹, Syrotkin A.K. (leading research worker)², Davydenko S.G. (senior research worker)³

Kashkin Research Institute of Medical Mycology of SEI APE SPb MAPE¹, Research Institute of griппe RAMS², Institute of Cytology RAS³, Saint Petersburg, Russia
© Collective of authors, 2008

We have discovered the lytic endofactor in cells of pathogenic for man *Fusarium javanicum* var. *radicicola* capable of reproduction and named mycovirus by us. This work has been registered as the scientific discovery (diploma N326) with priority 1st July, 1999.

Key words: allergens, fungal viruses, mycovirus *Fusarium javanicum* var. *radicicola* pathogenic for man, ridostin, statolon

Ранее были известны вирусы фитопатогенных грибов (около 50 видов): пенициллов, аспергиллов, сахаромикетов, муковок, а также 3-х видов фузариев – *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* [1], *F. poae* [2], *F. graminearum* [3]. Известно, что вирусы фитопатогенных грибов представляют собой организованные частицы величиной 20–50 нм, как правило, икосаэдрической формы [4]. Это рибонуклеиновые частицы, сегментированный геном которых содержит большей частью двунитевую РНК (ds-РНК), находящуюся внутри белкового капсида [2, 3, 5–7]. Однако известны фитопатогенные грибы, такие как *Agaricus bisporus*, *Sclerophthora macrospora* и *Pleurotus ostreatus*, геном вируса которых состоит из линейной единственной нити РНК (ss-РНК) [8–10]. А также редко, но встречаются микромицеты, геном вируса которых представлен двунитевой ДНК (ds-ДНК), как у *Rhizidiomyces* и *Rhizoctonia solani* [11, 12]. Известна молекулярная масса ds-РНК вирусов, пределы колебаний которой зависят от рода, вида и штамма гриба: с мелким сегментом — 1,4 килобаз (kb) – у *Botrytis cinerea* и с крупным – до 14,8 kb – у *Rhizopus microsporus* [13, 14].

Из немногочисленных данных по изучению вирусов фитопатогенных грибов следует, что наличие вирусных частиц в грибных клетках изменяет морфологию макроколоний, пигментацию, потерю воздушного мицелия, замедляет скорость роста [15–18]. Показано, что у ряда грибов продукция некоторых метаболитов, включая антибиотики и токсины, также зависит от присутствия в штамме гриба миковируса [17, 19]. Тем не менее, к настоящему времени нет однозначного ответа на вопрос – коррелируют ли определенные свойства гриба с присутствием в нем вируса? Так, итальянские ученые отмечают зависимость киллерной активности штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, продуцирующих токсин, от наличия ds-РНК вируса в этой культуре [20]; английские исследователи доказывают обратное, что между содержанием ds-РНК и охратоксином корреляции у штаммов вида *Aspergillus* не наблюдали [21]. В 2002 г. корейские ученые при исследовании вируса *Fusarium graminearum* установили, что присутствие ds-РНК коррелирует с изменением морфологии и роста гриба [3]. Ими же показано, что наличие ds-РНК в клетке гриба снижает вирулентность штамма. В связи с этими данными, можно отметить недостаточность изучения взаимоотношений фитопатогенных грибов с их внутриклеточным вирусом.

Функции ds-РНК вирусов грибов и возможности ее использования многообразны. Так, ds-РНК стимулирует образование антител и активирует другие механизмы иммунитета против опухолевых заболеваний [22]. ds-РНК может быть использована в качестве иммуномодулятора биологического происхождения для повышения иммуногенности антигенов [23]. В середине XX века впервые был получен пре-

парат под названием статолон, обладающий антивирусной и интерферон-индуцирующей активностью (продуцент – *Penicillium stoloniferum*) [24]. В конце XX и в начале XXI веков интерес к миковирусам «вспыхнул» вновь из-за поиска новых природных иммуномодуляторов.

В настоящее время в медицинской практике широко применяют природный индуктор интерферона – ридостин – лекарственный препарат, содержащий ds-РНК, выделенную из киллерных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* [25]. Ридостин обладает анти-ВИЧ-активностью, аналогичной активности азидотимидина, но при значительно меньшей токсичности [26]. Он перспективен также в клинической практике при гриппе, ОРВИ, бешенстве, энцефалитах, герпесе [27].

Кроме того, показано, что штаммы микроорганизмов изначально содержат вирусные и фаговые частицы (без заражения извне) и способны в определенных условиях освобождать вирус в окружающую среду. Такие штаммы обычно устойчивы к литическому действию собственного вируса. Однако, при некоторых условиях, подобные вирусы, накапливаясь в большом количестве, проявляют склонность к изменчивости и мутированию. Мутантные формы приобретают способность лизировать культуру-хозяина [4,28,29]. Это явление лизиса штаммов-продуцентов различных метаболитов опасно для производственных культур. Как сказано выше, изменение морфологии и ультраструктуры грибов под влиянием внутриклеточного вируса могут сопровождаться утратой важнейших признаков, характерных для каждого вида и штамма микромицета и учитываемых таксономистами, а также лицами, сохраняющими грибы-продуценты биологически активных веществ.

С учетом сказанного, изучение миковирусов и их взаимоотношений с «грибами-хозяевами» имеет большое научное и практическое значение.

В отличие от известных ранее вирусов грибов, патогенных для растений, нами обнаружен неизвестный ранее внутриклеточный вирус у *Fusarium javanicum* var. *radicicola* (*F. j. v. r.*), патогенного для человека. Генезис штамма № 69 *F. j. v. r.* выделен с пораженного участка руки больного; при дальнейшей естественной селекции этого штамма с оценкой интенсивности прорастания спор получены штаммы №69/73 и №69/9/6, составляющие банк производственных культур – продуцентов аллергенов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования послужил микромицет *Fusarium javanicum* var. *radicicola* штамм № 69, патогенный для человека. Он выделен в 1987 г. с пораженной кисти больного и хранится в музее культур грибов НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПб МАПО, а также селекционированные из него штаммы по интенсивности прорастания спор

№69/73, №69/9/6.¹ Газоны роста этих штаммов на агаризованной питательной среде (без оптимизации условий для репродукции МВ) служили тест-культурами.

1) Биологическую оценку спонтанного освобождения МВ в виде негативных колоний (н.к.) и обширных зон лизиса гриба проводили по описанным ранее методам, по аналогии с актинофагами [28, 29, 30], разработав при этом модификации для накопления МВ, создавая оптимальные условия, провоцирующие выявление МВ в клетках гриба *F. j. v. r.* за счет его интенсивной репродукции, на агаризованных и в жидких средах.

1) *Выявление вируса на агаризованной среде.* Модификация заключалась в варьировании pH среды и концентраций агара: pH устанавливали равным 4,5; 6,0; 8,0; использовали две среды – агар Сабуро с 4% глюкозы (АС) и пептонно-кукурузный (ПКА), концентрации агара — 2,0 и 1,4%. Опыты проводили в чашках Петри. В качестве контроля использовали среды с 2% агара, pH 6,5. Для доказательства факта, что зоны лизиса мицелия вызваны МВ, а не возникали под влиянием антибиотиков, ферментов или других химических факторов, продуцируемых культурой, ставили опыт на перевиваемость вируса, т.е. способность литического эндофактора к репродукции [31].

2) *Перевиваемость МВ.* Для перевиваемости МВ кусочки агара с лизированной зоной наносили в центр газона индикаторной к нему культуры *F. j. v. r.* на ПКА в чашках Петри и распределяли материал шпателем последовательно с I чашки на II, III-ю методом истощающегося мазка. Затем гриб выращивали в термостате при 28 °C в течение 3-х суток, после чего отмечали результат действия МВ на газон гриба. На 2-й и 3-й чашке наблюдали последовательное увеличение зоны лизиса мицелия, что служило доказательством содержания в исходной пробе размножающегося МВ [31].

3) *Выявление МВ в жидкой питательной среде.* Штамм гриба засеивали в колбу емкостью 750 мл с 150 мл пептонно-кукурузного бульона (ПКБ) при варьировании pH среды: 4,5; 6,2; 8,0 и выращивали при 27 °C на шуттель-аппарате при 100 об/мин в течение 72 час. После чего стерильный фильтрат закапывали на газон индикаторного штамма гриба в чашках Петри и выращивали гриб в термостате при 28 °C в течение 72 час. Затем отмечали результат действия МВ на мицелий гриба и ставили опыт на перевиваемость МВ. Контролем служил газон тест-культуры гриба без закапывания фильтрата или без нанесения кусочка стерильной зоны на центр газона [31].

4) *Для исследования фильтруемости МВ* гриб

1 Согласно атласу клинически значимых грибов *Fusarium javanicum* var. *radicicola* относят как синоним *F. solani* — специальная форма (forma speciale-radicicola). Впервые описан Мацумото и Соеджима (1976) в качестве причины кератита (de Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J. Atlas of Clinical Fungi, 2nd edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira I Virgili, 2000. S.1030).

выращивали на агаризованной среде (в оптимальных условиях для размножения вируса) при 28 °С в течение 72 ч. Затем кусочки агара с зонами лизиса переносили в колбу с мясо-петонным бульоном (МПБ без NaCl). Колбу оставляли на 7 час при комнатной температуре, периодически встряхивая. Известно, что если исследуемые зоны лизиса гриба вызваны вирусом, то он хоть в малом количестве, но перейдет в бульон. Затем из бульона получали стерильный фильтрат, используя фильтр Зейтца, и закапывали в виде петли на центр газона микромицета. Через 72 ч. выращивания газона при 28 °С отмечали стерильную зону лизиса газона по центру и ставили на перевиваемость, подтверждая наличие в лизированной зоне профильтрованного вируса. Контролем служил газон тест-гриба без нанесения фильтрата [31].

II. Для выделения МВ из гриба и изучения его морфологии штамм №69/9/6 выращивали глубинным методом в колбах со средой ПКБ рН 4,5 при 27 °С на шуттель-аппарате при 100 об/мин в течение 72 час. Затем мицелий отделяли от культуральной среды путем фильтрации через тройной слой стерильной марли, дважды промывали фосфатным буфером (100 mM натрия фосфата, рН 7,4; 10 mM магния хлорида) и удаляли избыток жидкости, помещая мицелий, завернутый в марлю, под пресс между слоями фильтровальной бумаги на 1 час. Отжатый мицелий в количестве 30 г замораживали в жидком азоте и растирали в порошок в фарфоровой ступке. Измельченный мицелий разводили в 200 мл фосфатного буфера и центрифугировали при ускорении 10 000 g в течение 20 мин для удаления клеточного детрита. Для осаждения вирусных частиц супернатант центрифугировали при 100 000 g в течение 2 часов на центрифуге L8 (Beckman, USA). Осадок ресуспендировали в 1 мл фосфатного буфера, наносили на линейный градиент 10-40% сахарозы и центрифугировали при 35 000 об/мин на бакет-ротаторе SW-50L в течение 1,5 часов [32, 33]. Микродозатором отбирали две четко сформированные зоны плотности 1,3 и 1,45 г/мл. 10 мк/мл взвеси из каждой зоны исследовали в электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Япония), используя стандартную методику негативного контрастирования: каплю взвеси наносили на тефлоновую подложку, сверху на каплю помещали медную сетку с углеродной подложкой на 1 мин, затем сетку однократно отмывали дистиллированной водой в течение 15 сек и контрастировали 1,5% раствором калия фосвольфрамата. Просмотр препаратов осуществляли при инструментальном увеличении 20000-50000. Съемку производили на пленку ФТ-41.

III. Для исследования внутриклеточного МВ штаммы гриба № 69 и №69/9/6 выращивали на агаризованной среде ПКА при оптимальных условиях для репродукции МВ и контрольных. Образцы с газона гриба обрабатывали по общепринятой методике: фиксация в «глутаральдегиде-осмии» с последующей заливкой в аралдит. Срезы изготавливали на ультрамикротоме типа LKB-4, контрастировали

по Рейнольдсу [34]. Материал анализировали в электронном микроскопе JEM-100SM [33].

IV. Культурально-морфологические свойства гриба изучали на агаризованной среде ПКА (в оптимальных условиях для репродукции вируса) и контрольных условиях, используя чашки Петри [33].

V. Исследовали спектр литического действия МВ на другие микромицеты, которые составили банк селекционированных нами ранее штаммов – продуцентов аллергенов, хранящихся в НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПб МАПО. Банк грибов представлен 10 нитчатыми микромицетами: *Aspergillus fumigatus*, *A. clavatus*, *A. niger*, *Penicillium notatum*, *P. sp.*, *P. verrucosum* var. *ciclopium*, *Fusarium javanicum* var. *radicicola*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus nigricans*, *Alternaria tenuis*.

Литический спектр вируса *Fusarium* определяли методом нанесения стерильных зон лизиса на свежесазанные газоны 10 тест-культур выше представленных грибов, которые выращивали на оптимальной для провокации миковируса агаризованной питательной среде в термостате (28 °С) в течение 5 суток и 2 суток – на свету при комнатной температуре. Контролем служили газоны культур, выросшие в тех же условиях, но без нанесения материала со стерильных зон лизиса [33].

VI. Целью последующего исследования было изучение особенности взаимоотношений вируса и «микромицета-хозяина» при различных температурах [35]. Селекционированный штамм (контроль) засевали на агаризованные среды в чашках Петри, в которые вносили по 0,1 мл суспензий спор. Суспензию спор готовили из 7-суточной, хорошо спорующей культуры, в стерильной дистиллированной воде. Затем освобождали ее от обрывков мицелия и комков спор фильтрованием через двойной бумажный фильтр ФО-ФС-15, медленной фильтрации. Приготовленная суспензия содержала $1 \cdot 10^6$ спор в 1 мл. Эту суспензию подвергали дифференциальной термообработке (ДТО) при 50 °С в течение 4 ч и при 70 °С – от 10 мин до 3 ч 40 мин, ступенчато, в 6 этапов. Контрольный штамм выращивали на 3-х агаризованных средах: агаре Сабуро с глюкозой и сусло-агаре с рН 6,2 при 28 °С, а также на сусло-агаре с рН 4,8 при 28 °С в течение 72 ч. Эти условия максимально провоцировали интенсивную репродукцию вирусных частиц (ВЧ) на газоне тест-культуры в виде негативных колоний (НК) или обширных зон лизиса мицелия; при этом использовали следующие условные обозначения: полный лизис мицелия (++++), слившиеся НК ВЧ (+++), много НК ВЧ (++) , единичные НК ВЧ (+), НК ВЧ отсутствуют (-). Вариант микромицета, споры которого после ДТО проявляли устойчивость к высокой температуре (70 °С) в течение 3 ч 40 мин и резистентность к лизису вирусом, был проверен на изменчивость клонов в популяции по морфологии колоний, устойчивости к внутриклеточному вирусу и интенсивности прорастания спор [36]. Изменчивость морфологии колоний к устойчивости клонов

к ВЧ изучали на агаре Сабуро, а интенсивность прорастания спор – в жидкой среде Сабуро. Оценивали, в среднем, по 100 вариантов. Количество проросших спор подсчитывали в процентах к общему числу спор в 10 полях зрения на микроскопе МБИ-15. Стабильность вариантов, по вышеперечисленным свойствам, проверяли в генерациях и по длительности сроков хранения. Полученные данные обрабатывали статистически методом сумм [37].

VII. Для изучения генома вируса в клетках «гриба-хозяина» *F. j. v. r.* необходимым условием для достижения цели было накопление достаточно большого количества ВЧ в клетках гриба. Известно, что ВЧ локализуется в цитоплазме, вакуолях и в спорах «гриба-хозяина». Поэтому было изучено накопление глубинных спор в динамике роста и развития микромицета при его глубинном периодическом выращивании на неохмеленном пивном сусле с 5,7% сахарозы при pH 4,7 в колбах емкостью 750 мл при постоянном встряхивании на шуттель-аппарате (100 об/мин) при 27 °C в течение 24 суток. Названную среду применяли в 2-х вариантах: без внесения дрожжевого экстракта (№1) и с добавлением его в количестве 2 мл на 100 мл среды (№2) [38]. Критериями контроля оптимального накопления спор служили: pH культуральной жидкости (КЖ), цитоморфология развития гиф и глубинных спор, лизис тест-культуры (ТК) при закапывании КЖ на поверхность ее газона и электронно-микроскопическое исследование срезов материала гриба. Для последнего исследования образцы гриба обрабатывали по общепринятой методике с 2-х сред [33, 34, 38]. При этом использовали электронный микроскоп JEM-100 SM. В качестве ТК использовали штамм №69/9/6 *F. j. v. r.*, выращенный на агаризованном сусле pH 4,5 при 28 °C в течение 3 суток.

Цитоморфологию гриба изучали в окрашенных метиленовым синим препаратах, приготовленных из КЖ через 2,3,6,11,13,16,24 суток выращивания ТК, используя биологический микроскоп МБИ-15 [38, 39].

VIII. 16-суточный мицелий, полученный в результате глубинного выращивания *F. j. v. r.* (см. выше VII), использовали для изучения генома внутриклеточно-го МВ.

Мицелий отделяли от КЖ фильтрованием через марлю, промывали дважды ТЕ-буферным раствором (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), излишек влаги удаляли фильтровальной бумагой.

Разрушение клеток производили после замораживания 5 г мицелия в жидком азоте и последующего растирания пестиком в стерильной фарфоровой ступке до гомогенного состояния, постепенно добавляя 2 мл буфера LETS (0,1 M LiCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% SDS), 0,5 мл суспензии переносили в пробирку Эппендорфа и добавляли 0,5 мл фенола, насыщенного LETS, перемешивали 1 мин на вортексе, центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Отбирали супернатант и добавляли к нему равный объем хлороформа, перемешивали 1

мин на вортексе, отбирали супернатант и добавляли к нему равный объем смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в соотношении 24:1. Верхнюю фазу отбирали, добавляли к ней 2,5 объема 96% этанола и оставляли на 12 час при 20 °C для осаждения. Затем пробу центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин. Осадок растворяли в буфере ТЕ с последующим переосаждением дважды 2,5 объемами 96% этанола (12 час — при 20 °C), осадок растворяли в буфере ТЕ и проводили высаливание до концентрации 2 M и 4 M LiCl в течение 12 час при 4 °C. Пробы центрифугировали 10 мин при 14000 об/мин, дважды переосаждали 2,5 объемами 96% этилового спирта (12 час — при 20 °C). Осадок растворяли в буфере ТЕ.

Идентификацию НК проводили электрофоретически в буфере TBE с использованием 1% или 1,4% агарозного геля. НК окрашивали бромистым этидием.

Для более точной характеристики полученных НК пробы обрабатывали ферментами — РНКазой А и ДНКазой I. РНКазы А (Bovine Pancreas, фирма Sigma, США) выделена из поджелудочной железы быка. Рабочий раствор — 15 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Конечная концентрация — 10 мкг/мл. ДНКазы I — панкреатическая (фирма Worthington, США). Рабочий раствор — 1 mM MgCl₂, 1 mM Tris-HCl, pH 7,5. Конечная концентрация — 5 мкг/мл.

В первом случае к 20 мкл пробы добавляли 5 мкл РНКазы А и инкубировали 40 мин при 37 °C; во втором — к 20 мкл пробы добавляли 2 мкл ДНКазы I и 1 мкл РНКазина; инкубировали 30 мин при 37 °C. РНКазин — сильный ингибитор РНКаз. Данный белок выделяют из печени крыс или человеческой плаценты. Он эффективно ингибирует РНКазу при трансляции в бесклеточной системе и его широко используют в ферментных реакциях. Все пробы для электрофоретического анализа готовили следующим образом. Осадок растворяли в буфере ТЕ, затем добавляли буфер для проб (0,25% — бромфеноловый синий, 0,25% — ксилолцианол, 30% — глицерин) — 1/6 от объема пробы [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований получены следующие данные.

I. — На отдельно изученных штаммах патогенного *F. j. v. r.*, обнаружен литический фактор, способный к размножению, названный нами миковирусом (МВ). Способность МВ к размножению доказана по переносимости фактора [31].

— Определены сравнительно оптимальные условия, обеспечивающие интенсивную репродукцию МВ и его выявление при выращивании гриба на агаризованной и в жидкой средах в виде негативных колоний или зон лизиса.

Описание колоний и газонов с лизисом мицелия представлены на пептонно-кукурузном агаре (ПКА) с концентрацией агара 1,4%, pH среды 4,5 и засеянным взвесью спор: точно и газоном [31,38]; в жидком

пептонно-кукурузном бульоне (ПКБ) с рН 4,5 [31].

- МВ – микробъект, фильтрующийся через фильтр Зейтца асбестовый и миллипоровый диаметром пор 0,22 $\mu\text{м}$. Содержимое фильтрата репродуцируется при перевивках на газоне тест-культуры [31].

II. При негативном контрастировании образцов из выращенного гриба во фракции плотностью 1,30 г/мл выявлены вирусные частицы (ВЧ) икосаэдрической формы. ВЧ I типа диаметром 20-25 нм, II типа – диаметром 53 нм [33].

III. В ультратонких срезах мицелия, выращенного при оптимальных и контрольных условиях на агаризованных средах, внутриклеточный МВ выявлен в виде электронноплотных частичек, локализованных в цитоплазме клеток гриба. Размеры внутриклеточных ВЧ 2-х типов: 23-28 нм и 40-55 нм [33]. При этом на срезах мицелия выявлены патоморфологические изменения в ультраструктуре клеток, представленных двумя типами: темными — с электронноплотным содержимым и светлыми — с низкой электронной плотностью. В контрольных вариантах преобладали темные клетки, в опытных – светлые [33]. В «темных» клетках нарушений структуры клеток не выявлено, ВЧ в умеренном количестве локализованы в цитоплазме [33]. Для светлых клеток характерно снижение электронной плотности цитоплазмы; изменялась также структура митохондрий – в них уменьшалось количество крист и они были слабо выражены; количество ВЧ увеличено в сравнении с контрольными условиями выращивания гриба [33].

IV. При оптимальных условиях для идентификации репродукции ВЧ выявлены также изменения культурально-морфологических свойств гриба, что выразилось в замедленном росте колоний, их малом размере, полулизированном или с неровным краем колоний. Воздушный мицелий ослабленный, с наличием НК или зонами лизиса, измененной пигментацией; конидии уменьшены в размере в 1,5-2 раза в сравнении с развитием колоний в контрольных условиях [33]. Влияние МВ на культурально-морфологические свойства при оптимальных условиях выращивания гриба различно в зависимости от штаммов. Так, у исходного штамма наблюдали почти полный лизис газона из воздушного мицелия гриба в сравнении с селекционированным штаммом [33].

V. Литический спектр МВ *F. j. v. r.* выявлен на 5 видах микромицетов из 10 представленных в условиях эксперимента: *Fusarium javanicum* (4+), *Aspergillus clavatus* (3+), *A. fumigatus* (3+), *Penicillium* species (3+), *Alternaria tenuis* (2+) [33]. Кроме зон лизиса мицелия на газоне чувствительных к МВ культур, отмечен ослабленный рост воздушного мицелия и изменение его пигментации в сравнении с контрольными газонами тест-культур без воздействия МВ.

Проявление литических свойств МВ зависит от ряда особенностей: самого вируса, чувствительности к нему микробной культуры, состава среды и условий выращивания (температуры, аэрации) по

анalogии с фагами бактерий [28]. Вирус, проявляющий литическое действие только в отношении культуры «гриба-хозяина» в адекватных условиях (состав среды, определенная концентрация агара в ней, соответствующая рН и температурные условия), является специфическим. МВ, обладающий широким спектром ЛД на другие культуры, как в нашем исследовании, мы обозначаем *полимикровирусом*.

VI. Изучены особенности взаимоотношений внутриклеточного вируса с грибом-хозяином *F. j. v. r.* при различных температурах. ДТО индуцирован вариант микромицета, устойчивый к собственным ВЧ на питательной среде, оптимальной для репродукции ВЧ [35]. Клоны популяции вирусоустойчивого (ВУ) варианта микромицета исследовали на изменчивость по некоторым морфолого-биологическим свойствам: особенностям формирования колоний, интенсивности прорастания спор, устойчивости к литическому действию (ЛД) ВЧ. Морфология колоний при этом не изменялась – популяция состояла из гомогенных клонов. Отмечена большая вариабельность свойств устойчивости конов к ЛД ВЧ при хранении, а также выявлена нестабильность этого признака в генерациях. Заметно варьировали показатели изменчивости свойств интенсивности прорастания спор [35]. В итоге селекционированы штаммы *F. j. v. r.* с активностью прорастания спор, достигающей почти 90%. Они стабильны в генерациях и могут быть использованы при создании отечественных тест-систем для микоаллергодиагностики. Экспериментально показано, что интенсификация прорастания спор гриба после ДТО взаимосвязана с частичным ЛД внутриклеточных ВЧ на «культуру-хозяина». Варианты гриба, устойчивые к ВЧ, как правило, низко активны по прорастанию спор, что подтверждает сложности имеющих место взаимоотношений внутриклеточных ВЧ с «грибом-хозяином».

VII. В результате проведенных исследований для накопления ВЧ в мицелии «гриба-хозяина» при глубинном его выращивании в аэрируемых условиях разработана оптимальная среда №2 – неохмеленное пивное сусло с добавлением дрожжевого экстракта. На 16 сутки культивирования гриба для нее, в отличие от среды №1 без дрожжевого экстракта, характерно:

- сплошной лизис тест-культуры (ТК) при закапывании КЖ на ее газон в виде петли (по центру) [38];
- образование массы свободных набухших глубинных спор [38];
- большое количество внутриклеточного вируса в виде электронно-плотных частиц в клетках «гриба-хозяина» *F. j. v. r.* [38].

При этом в указанный период на среде №2 масса внутриклеточных ВЧ коррелирует с образованием большого количества свободных набухших глубинных спор и полным лизисом ТК при закапывании КЖ на поверхность ее газона.

VIII. Оптимальная среда №2 для накопления внутриклеточного МВ была использована при выращи-

вании мицелия с целью изучения генома ВЧ в клетках «гриба-хозяина». Проведено трехкратное выращивание мицелия с последующими экстракциями из него нуклеиновых кислот и анализом их с помощью электрофореза в агарозном геле. В итоге обнаружена высокомолекулярная фракция L, размером около 10 тыс. пар нуклеиновых оснований (kb), устойчивая к ДНКазе и, по нашим данным, представляющая собой двунитевую РНК (ds-РНК) [38].

Полученные экспериментальные данные могут быть интерпретированы следующим образом. На примере патогенных штаммов нитчатого гриба *Fusarium javanicum* var. *radicicola* нами показана вирусная природа литического фактора, названного миковирусом (МВ).

Известно, что штаммы бактерий и грибов, содержащие вирусные частицы, без заражения извне, способны в определенных условиях выделять вирус в окружающую среду. Такие штаммы обычно устойчивы к литическому действию собственного вируса. Однако, при некоторых условиях, подобные вирусы накапливаются в большом количестве и проявляют склонность к изменчивости и мутированию. Мутантные формы и, возможно, склонность их к интенсивной репродукции, приобретают способность лизировать культуру-хозяина [4, 28, 29].

Наличие внутриклеточного МВ у *F. j. v. r.* доказано нами по ряду критериев:

1) Симптоматически, в виде негативных колоний (НК) или обширных зон лизиса воздушного мицелия на газоне тест-культуры «гриба-хозяина» как при ограниченном спонтанном освобождении ВЧ, так и по интенсивности их репродукции под влиянием определенных условий: температурного воздействия (70 °C 2 ч 20 мин до 3 ч), определенной концентрации агара (1,4%), показателя pH среды (pH 4,5–4,7), разных по составу питательных сред (пептонно-кукурузный агар и бульон; неохмеленное пивное сусло с добавлением дрожжевого экстракта).

2) При создании оптимальных условий для накопления литического фактора из *F. j. v. r.* на агаризованной и в жидкой средах мы исходили из того факта, что ВЧ из зон лизиса мицелия при встряхивании переходят в мясо-пептонный бульон [28, 29], таким образом мы накопили ВЧ, что видно по четкой зоне лизиса мицелия на газоне тест-культуры гриба [31].

3) Также показана перевиваемость литического фактора (ЛФ) на газоне тест-культуры гриба, полученного на агаризованной и жидкой средах, что служит доказательством биологической природы ЛФ, способного к репродукции, т.е. ЛФ патогенного штамма гриба *F. j. v. r.* является вирусом [31].

4) Фильтрат, полученный нами из накопленного ЛФ в мясо-пептонном бульоне, доказывает фильтрующиеся свойства данного объекта – МВ *F. j. v. r.*

5) При исследовании в электронном микроскопе при негативном контрастировании МВ показан в виде икосаэдрических ВЧ.

6) В ультратонких срезах мицелия обнаружен в

виде электронно-плотных частичек, локализующихся в цитоплазме и вакуолях клетки гриба.

7) По размерам ВЧ во внутриклеточном и изолированном виде практически одинаковы – 2-х типов: 23–28 нм и 40–55 нм.

8) МВ *F. j. v. r.* определены нами как полимиковирус с относительно широким спектром литического действия (ЛД), выявленном на 5 видах микромицетов из 10 проверенных. Известно, что вирус, проявляющий ЛД только на свою культуру, является специфическим; миковирус, обладающий широким ЛД на другие культуры микромицетов, является вирусом широкого спектра ЛД (полимиковирусом).

9) Под влиянием МВ *F. j. v. r.* при оптимальных условиях для интенсификации репродукции ВЧ выявлены патоморфологические, культуральные и ультраструктурные изменения клетки «гриба-хозяина» ВЧ. Но полного летального действия МВ на гриб не наблюдали. Очевидно, это можно объяснить антибиотическим взаимоотношением внутриклеточных ВЧ с «микромицетом-хозяином» и какими-то защитными структурами гриба, в частности, клеточной стенкой.

10) Разработаны условия периодического глубокого выращивания гриба *F. j. v. r.* в колбах с целью интенсивного внутриклеточного накопления МВ. В процессе выращивания мицелия в жидком неохмеленном сусле с добавлением дрожжевого экстракта отмечена корреляция между максимальной репродукцией МВ и такими параметрами, как образование в культуральной жидкости (КЖ) глубинных спор и сплошной зоной лизиса газона тест-культуры при закапывании на нее КЖ, а также электронной микроскопией — цитоплазма клетки сплошь «забита» ВЧ. Биомассу 16-суточного мицелия использовали для изучения генома внутриклеточного вируса.

11) Из мицелия патогенного штамма *F. j. v. r.* выделена высокомолекулярная фракция (10 тысяч пар нуклеиновых оснований), устойчивая к ДНКазе, и, по нашим данным, представляющая собой двунитевую РНК (ds-РНК). Из литературных данных, на примере миковирусов фитопатогенных грибов, известны ВЧ с сегментированным геномом, представленным несколькими видами двунитевой РНК (ds-РНК), молекулярная масса которых от малых размеров 1,4 kb (*Botrytis cinerea*) до крупных – 14,8 kb (*Rhizopus microsporus*) [13,14]. В наших исследованиях геном МВ *F. j. v. r.* представлен ds-РНК с молекулярной массой 10 kb. При обработке проб специфическим белком РНКазой ДНКазы не разрушала высокомолекулярную фракцию L. Используемая в нашем эксперименте РНКазы А разрушает преимущественно одонитевые участки. Можно сделать вывод, что геном МВ гриба *F. j. v. r.* действительно представлен ds-РНК с молекулярной массой 10 kb.

С помощью электронного микроскопа изучена морфология ВЧ и определена икосаэдрическая форма их 2-х размеров: I тип — диаметром 20–25 нм и II — 53 нм. ВЧ в виде электронно-плотных частичек

и практически такого же размера, локализованные в цитоплазме клетки гриба, обнаружены в ультратонких срезах клеток «гриба-хозяина».

Показан широкий литический спектр вируса *F. javanicum* var. *radicicola* на другие микромицеты, в связи с чем он назван *полимикровирусом*.

Авторами разработана оптимальная питательная среда (№2) для глубинного выращивания гриба *F. javanicum* var. *radicicola* с целью накопления ВЧ в клетках «гриба-хозяина» для изучения генома вируса *F. javanicum* var. *radicicola*, представленный высокомолекулярной фракцией размером порядка 10 тысяч пар нуклеиновых оснований (kb), устойчивой к ДНКазе и представляющей собой двунитевую РНК (ds-РНК).

Авторами теоретически и экспериментально установлен неизвестный ранее объект материального мира — вирус гриба *Fusarium javanicum* var. *radicicola* WR., патогенного для человека, заключающийся в том, что обнаруженный литический фактор мицелиального, патогенного для человека гриба *F. javanicum* var. *radicicola* способен к фильтрации и репродукции и назван микровирусом. Ранее известны вирусы грибов, патогенных для растений.

Открытие вируса гриба *F. javanicum* var. *radicicola*, патогенного для человека, имеет большое значение для фундаментальной науки как вновь открытый, ра-

нее неизвестный, объект материального мира, имеющий значение для лабораторной и клинической медицинской микологии. Для первой открытия вируса важно с таксономической точки зрения применительно к микромицетам-фузариям, а также для хранения музейных и производственных культур грибов. Так, под влиянием вируса могут изменяться макро- и микроморфологии «гриба-хозяина», а также и его микроструктуры, что сопровождается утратой важных признаков, характерных для вида и штамма микромицета, возможен и лизис мицелия селекционированных штаммов грибов — продуцентов аллергенов. В связи с этим авторами даны рекомендации по условиям хранения селекционированных штаммов с внутриклеточным вирусом.

Селекционированные штаммы *F. javanicum* var. *radicicola* являются продуцентами аллергенов и находятся на хранении в коллекции культур НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина СПб МАПО. Аллергеноактивные препараты, получаемые из этих штаммов грибов, можно использовать в клинико-микологической практике для микоаллергодиагностики.

МААНОИ признало выполненную работу открытием под названием «Внутриклеточный вирус» с приоритетом 1.07.1999 г. [40].

ЛИТЕРАТУРА

1. Nogawa M., Kageyama T., Nakatani A., et al. Cloning and characterization of mycovirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* // Biosci. Biotechnol. Biochem.-1996.-Т.60, №5.-P.784-788.
2. Campel P., Papp I., Bibo M., et al. Genetic interrelationships and genome organization of double elements of *Fusarium poae* // Virus Genes.-1999.-Vol.18, №1.-P.49-56.
3. Yeon-Mee Chu, Jae-Jin Jeon, Sand-Jin Yea, et al. Double-stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum* // Applied and Environmental Microbiology.-2002.- P.2529-2534.
4. Бобырь А.Д., Садовский Ю.П. Вирусы грибов, их ингибирующие и индуцирующие свойства. — Киев:Наукова думка, 1978.- 126 с.
5. Wickner R.B. The killer double-stranded RNA plasmids of yeast // Plasmid.- 1979.- Vol. 2.- P. 303-322.
6. Van der Lende T.R., Harmsen Go S.J., Wessel J.G.H. Double-stranded RNA mycoviruses in micelium of *Pleurotus ostreatus* // FEMS Microbiology Letters.-1995.- Vol.125, N 1.- P.51-56.
7. Ikeda K., Nakamura H., Arakawa M., et al. Dynamics of double-stranded RNA segments in a *Helicobasidium mompa* clone from a tulip tree plantation // FEMS Microbiol., Ecology. / In Press Corrected proof, Available online 11-2004.
8. Revill P.A., Davidson A.D., Wright P.J. The nucleotide sequence and genome organization of mushroom bacilliform virus: a single-stranded RNA virus of *Agaricus bisporus* (Lange) // Imbach.Virology.- 1994.- Vol.202.- P. 904-911.
9. Yokoi T., Takemoto V., Suzuki M., et al. The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* virus B // Virology.- 1999.-Vol.264.- P. 344-349.
10. Hyun Jue Vn., Dongbin L., Hyun-Sook L. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus* // Virology.- 2003.- Vol. 314, N 1.- P. 9 -15.
11. Dawe V.H., Kuhn C.W. Isolation and characterization of double-stranded DNA mycovirus infecting the aquatic fungus, *Rhizidiomyces* // Virology.- 1983.- Vol. 130.- P. 21-28.
12. Zhang J., Liang P. A double-stranded DNA mycovirus in *Rhizoctonia solani* // Clin.J.Virol.-1993.- Vol.9.- P.386-389.
13. Castro M., Kramer K., Valdiviul L., et al. A new double-stranded RNA mycovirus from *Botrytis cinerea* // FEMS Microbiology Letters.-1999.- Vol.175, N 1.- P.95-99.
14. Papp T., Nyilasi I., Fekete C., et al. Presence of double-stranded RNA and virus-like particles in *Rhizopus* isolates // Can. J. Microbil.-2001.- Vol.47.- P.443-447.
15. Banks G.T., Buck K.W., Chain E.B. et al. Viruses in fungi and interferon stimulation // Nature. — 1968.—Vol. 218, may 11. - P. 542-545.
16. Гаузе Г.Ф., Максимов Т.С., Дудник Ю.В. и др. Новые штаммы вирусов, выделенные из плесневых грибов рода *Penicillium* // Микробиология.-1971.-Т.XL, Вып.3.-С.540-543.
17. Hollings M., Stone O.M. Viruses in fungi // Sci. Progr.-1969.-Vol.57, №4.-P.371-377.
18. Гребенюк Н.В., Грама Д.П. Морфология *Penicillium funiculosum* Thom., пораженного вирусом // Микробиол. журн.- 1971.-Т.33, вып.3.-С. 364-368.

19. Adler J.P., Mackenzie D.W. Fungal viruses: intrahyphal localization of *Penicillium stoloniferum* viruses by fluorescent antibody // Abstr. Inn.Meet. Amer.Soc. Microbiol.-1972.- Vol.72, №1.-P.68-73.
20. Conti W.M.S., Gorloni M., Bertolotti D., et al. Yeast Killer System // Clin. Microbiol.Rev.-1997.- P.369-400.
21. Varega J., Rinyu E., Kevei E., et al. Double-stranded RNA mycoviruses in species of *Aspergillus* sections Circumdati and Fumigati // Can.J.Microbiol.-1998.-Vol.44.- P.569-574.
22. Braum W., Nakano M. Influence of oligodeoxyribonucleotides on early events in antibody formation //Proc.Soc.Exp.Biol. and Med.-1965.-Vol.119, N6.-P.701-708.
23. Елинов Н.П. Микология – на рубеже веков, на рубеже тысячелетий // Микология и Фитопатология.-1995.- Т.29, №1.-С.3-10.
24. Powell H.M., Walcher D.M., Mast M. Antiviral action of statolon against koxaacie A 21/col virus //Antibiot. And Cheomother.-1962.- Vol.12, N5.-P.337-341.
25. Булычев А.Е., Сергеев А.Н., Рыжиков А.Б. и др. Изучение динамики интерферонообразования в организме у белых мышей при разных путях введения индуктора интерферона ридостина // Антибиотики и химиотерапия.-1998.-Т.43, №4.- С.20-23.
26. Носик Н.Н., Носик Н.И., Кузнецов Н.В. Ингибирующее действие индукторов интерферона на размножение вируса иммунодефицита человека //Вопросы вирусологии.- 1992.- Т.37, №2.- С. 92-94.
27. Булычев А.Е., Гончарова Е.П., Пьянкова О.Г. и др. Некоторые аспекты интерферонообразования в организме белых мышей // Вестник Российской Академии медицинских наук.-1998.-№4.-С.34-37.
28. Раутенштейн Я.И. Бактериофагия.- М.: АН СССР, 1955.- 142 с.
29. Журавлева Н.П. Изменчивость продуцента леворина *Actinomyces levoris* Krass. под влиянием специфического фага и гитромицина Б: Автореф. Дисс.канд.мед.наук.- Л., 1976.- 19 с.
30. Жукова Р.А., Коммунарская А.Д., Пронина М.И., Терешин И.М., Журавлева Н.П., Шабас М.Н. Методы селекции продуцентов антибиотиков и ферментов.- Л.: Медицина, 1978. — С. 94-101.
31. Журавлева Н.П., Зуева Е.В., Бегаева Н.Н. Спонтанное освобождение вирусных частиц при хранении селекционированных микромицетов – продуцентов аллергенов // Ж. Проблемы медицинской микологии.-1999.-Т.1, №2. — С. 45–50.
32. Vilches S., Castillo A. A double-stranded RNA mycovirus in *Botrytis cinerea* // FEMS Microbiology Letters.-1997.- Vol.155.- P.125-130.
33. Журавлева Н.П., Елинов Н.П., Семенов В.В., Сироткин А.К., Зуева Е.В. Индукция вирусных частиц в клетках *Fusarium javanicum* var. *radicicola* WR и их свойства // Ж. Проблемы медицинской микологии .-2004.-Т.6, №3. — С. 44–54.
34. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in microscopy // J. of Cell Biology.-1963.- Vol.17.-P.208-212.
35. Журавлева Н.П., Елинов Н.П., Васильева Н.В. Особенности взаимоотношений вируса и микромицета-хозяина *Fusarium javanicum* var. *radicicola* при различных температурах // Ж. «Проблемы медицинской микологии».- 2004, Т.6, № 4. — С. 27–32.
36. Захаров И.А., Квитко К.В. Генетика микроорганизмов –Л., 1967. С. 92-96.
37. Плохинский Н.А. Биометрия. — Новосибирск, 1970.
38. Журавлева Н.П., Елинов Н.П., Давыденко С.Г. и др. Вирусный геном в клетках *Fusarium javanicum* var. *radicicola*, патогенного для человека // Ж. «Проблемы медицинской микологии». — 2005. — Т. 7, №1. — С. 33–40.
39. Журавлева Н.П., Танкевич М.Е., Жукова Р.А., Большакова Е.Н. Цикл развития и цитоморфологические особенности продуцента олеандомицина *Streptomyces antibioticus* // Ж. Антибиотики. — 1982. — № 9. — С. 3–5.
40. Потоцкий В.В. Научные открытия, идеи, гипотезы (1992–2007). Информационно-аналитический обзор. — М., 2008. — С. 306–307.

Поступила в редакцию журнала 25.03.08

Рецензировано: экспертной комиссией Международной Академии авторов научных открытий и изобретений по заявке на открытие №А-406 от 06.02.2006 г.

