

**ТАКСОНОМІЧНИЙ СТАТУС ЗБУДНИКА БЛІДО-ЗЕЛЕНОЇ
КАРЛИКОВОСТІ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР І ПРОПОЗИЦІЯ
ПРО ЗАСНУВАННЯ В КЛАСІ *MOLLICUTES*,
ПОРЯДКУ III *ACHOLEPLASMATALES*, РОДИНИ I *ACHOLEPLASMATACEAE*,
РОДУ II *PLURAPLASMA GEN. NOV.* ТА ЙОГО ПЕРШОГО ВИДУ
*PLURAPLASMA GRANULUM SP. NOV.***

І.Г.Скрипаль, О.В.Єгоров

Інститут мікробіології і вірусології НАН України
вул.Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП Д 03680, Україна

У статті наведені дані про таксономічний статус збудника блідо-зеленої карликовості зернових (ЗБЗКЗ). Цей збудник раніше був визначений як фітопатогенний варіант молікута *Acholeplasma laidlawii* та названий *A. laidlawii var. granulum*. ЗБЗКЗ, окрім фітопатогенності, має такі фундаментальні відмінності від *A. laidlawii*: дуже великий геном розміром від 2200 тисяч пар нуклеотидів (т.п.н.) до 2310 т.п.н., що практично дорівнює сумі геномів *A. laidlawii* (1600 т.п.н.) і фітоплазм (710 т.п.н.); дві форми ДНК-залежної РНК-полімерази (у *A. laidlawii* функціонує одна форма); здатність утворювати позаклітинну фруктозобісфосфатазу подібно до його гіпотетичного філогенетичного попередника бактерії *Bacillus subtilis*; наявність багатьох ферментативних активностей, відсутніх у ахолеплазм; своєрідна реакція на наявність у живильних середовищах стеринів не характерна для всіх відомих ахолеплазм; надзвичайно багатий за кількістю і якістю склад антигенів, здатних реагувати майже гомологічно з антитілами до представників роду *Acholeplasma* і окремих видів роду *Mycoplasma*; велика подібність (понад 88%) сиквенсів 16S рРНК ЗБЗКЗ і представників роду *Phytoplasma* та інші властивості, описані в статті. Зроблено висновок, що на підставі своїх властивостей ЗБЗКЗ не може бути віднесений до жодного з існуючих родів класу *Mollicutes*, бо за всіма ознаками цей молікут представляє перехідну форму мікроорганізму, є невідомим до теперішнього часу ланцюгом між цими родами молікутів і спороносними бактеріями. ЗБЗКЗ є вірогідним представником попередника молікутів з геномом до 1600 т.п.н. і, в першу чергу, родів *Acholeplasma* та *Phytoplasma*, які з'явилися внаслідок еволюційного розщеплення його геному.

На підставі цього рекомендується для ЗБЗКЗ в класі *Mollicutes*, порядку III *Acholeplasmatales*, родині I *Acholeplasmataceae* заснувати новий рід II *Pluraplasma gen. nov.* та його перший вид *Pluraplasma granulum sp. nov.*, типовим представником якого є штам 118.

Ключові слова: таксономічний статус, збудник блідо-зеленої карликовості зернових, біологічні властивості, генетичні властивості, сиквенс 16S рРНК, клас *Mollicutes*, родина *Acholeplasmataceae*, рід *Pluraplasma gen. nov.*, вид *Pluraplasma granulum sp. nov.*, типовий штам 118.

TAXONOMIC STATUS OF THE AGENT OF CEREALS PALE-GREEN DWARF AND PROPOSITION OF FOUNDING IN THE CLASS OF MOLLICUTES, OF THE ORDER III ACHOLEPLASMATALES, FAMILY I ACHOLEPLASMATACEAE, GENUS II PLURAPLASMA GEN. NOV., AND ITS FIRST SPECIES PLURAPLASMA GRANULUM SP. NOV.

I.G.Skripal, O.V.Yegorov

*Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine
154, Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP D 03680, Ukraine*

The data are presented on taxonomic status of the agent of cereals pale-green dwarf (ACPGD) which has been defined as the phytopathogenic variant of the mollicute *Acholeplasma laidlawii* and called *A. laidlawii var. granulum*. Phytopathogenicity of ACPGD possess several fundamental differences from *A. laidlawii* as: large genome consisting of 2,200 thousand pairs of nucleotides (t.p.n.) to 2,310 t.p.n. that practically equals a sum of genomes of *A. laidlawii* (1,600 t.p.n.) and phytoplasmas (710 t.p.n.); two forms of DNA-dependent RNA-polymerase (only form functions in *A. laidlawii*); capacity to form extracellular fructosobisphosphatase that looks like its hypothetical phylogenetic precursor on bacteria *Bacillus subtilis*; availability of numerous enzymatic activities that are absent in acholeplasmas; peculiar relation to sterols availability in nutrient media that is not characteristic for the known acholeplasmas; extremely rich, as to quantity and quality, composition of antigens capable of reacting almost homologously with antibodies against representatives of *Acholeplasma* genus and separate species of *Mycoplasma* genus; great similarity (above 88 %) of sequences of 16S rRNA of ACPGD and representatives of *Phytoplasma* genus; other properties. It is concluded, that taking into account its characteristics, ACPGD cannot be referred to either of existing genera of the *Mollicutes* class, since according to its features, this mollicute is a transition form of the microorganism. It is the hitherto an unknown chain between these genera of mollicutes and sporiferous bacteria. ACPGD can be representative of mollicute precursor with genome of about 1,600 t.p.n. and of genera *Acholeplasma* and *Phytoplasma* that arised as a result of evolutionary splitting of their genome.

Thus, it is recommended to include ACPGD in the *Mollicutes* class, order III *Acholeplasmatales*, family I *Acholeplasmataceae* as a new genus II *Pluraplasma gen. nov.*, and its first species *Pluraplasma granulum sp. nov.*, strain 118, being its typical representative.

Key words: taxonomic status, agent of cereals pale-green dwarf (ACPGD), biological, genetic characteristics, sequence, 16S rRNA, class *Mollicutes*, family *Acholeplasmataceae*, genus *Pluraplasma gen. nov.*, species *Pluraplasma granulum sp. nov.*, typical strain 118.

Питання про таксономічний статус збудника блідо-зеленої карликовості зернових (ЗБЗКЗ) культур постало відразу ж після того, як він у 1972 р. був виділений у чисту мікробіологічну культуру та для нього була підтверджена триада Коха [3,7]. На підставі вивчення фізіолого-біохімічних і серологічних властивостей ЗБЗКЗ [1–6] він визначений як фітопатогенний варіант *Acholeplasma laidlawii*, спеціалізований інфікувати в основному зернові культури. Оскільки його вперше виділили з хворої на ЗБЗКЗ пшениці, то йому дали назву *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum*.

Більш детальне і глибоке вивчення властивостей ЗБЗКЗ вказувало, що його не можна беззаперечно вважати фітопатогенним варіантом *A. laidlawii* не тільки через властиві лише йому ознаки, а й через велику серологічну спорідненість з іншими видами роду *Acholeplasma* і навіть з окремими представниками роду *Mycoplasma* [1, 2, 15, 16]. При подальшому вивченні молекулярно-біологічних [11, 21, 22], біохімічних [8, 14, 21, 22] і, особливо, генетичних [9, 20] властивостей були одержані дані, які викликали сумніви у правильності ідентифікації ЗБЗКЗ як *A. laidlawii* var. *granulum*.

У цій роботі ми аналізуємо одержані раніше дані та наводимо результати вивчення сиквенсів 16S рибосомальних РНК чотирьох штамів ЗБЗКЗ порівняно з сиквенсами 16S рРНК споріднених видів молюкутів. У результаті такого порівняння та перегляду ми приходимо до висновку, що ЗБЗКЗ є своєрідним і навіть дивним молюкутом, якого не можна віднести до жодного з існуючих родів класу *Mollicutes*, бо за всіма ознаками він є представником невідомої на сьогодні проміжної ланки між клостридіальною гілкою бактерій та молюкутами. Принаймні на це вказує розмір геному ЗБЗКЗ, який становить залежно від штаму 2200–2310 т.п.н., що дорівнює близько половини геному *Bacillus subtilis*, який у цієї бактерії має розмір 4200 т.п.н. [20].

За генетичними, серологічними властивостями і багатьма біохімічними ознаками штами ЗБЗКЗ можуть представляти, на наш погляд, одного з предків таких родів молюкутів, як *Acholeplasma* та *Phytoplasma*. Водночас його не можна ототожнювати з жодним із них. ЗБЗКЗ має великий геном – 2310 т.п.н., якого досить на утворення геномів ахोлеплазм (1600 т.п.н.) і фітоплазм (710 т.п.н.), та дві ДНК-залежні РНК-полімерази. Крім цього, він здатний утворювати позаклітинну фруктозобісфосфатазу. Ми вважаємо, що при еволюційному розщепленні одна із форм ДНК-залежної РНК-полімерази дісталася у спадок ахोлеплазмам, а другу форму ДНК-залежної РНК-полімерази і здатність утворювати позаклітинно фруктозобісфосфатазу успадкували фітоплазми, завдяки чому вони здатні викликати захворювання рослин на „жовтяниці”.

На підставі викладених нижче результатів ми пропонуємо в класі *Mollicutes*, порядку III *Acholeplasmatales*, родині I *Acholeplasmataceae* заснувати рід II *Pluraplasma* gen. nov., і перший вид, який його представляє – *Pluraplasma granulum* sp. nova. Підстави для цього ми наводимо в даній статті.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Тут ми не наводимо методів, які були описані нами в попередніх роботах та на які ми робимо посилання в цій роботі. Детально описуємо методику ампліфікації та сиквенсу 16S рРНК типових штамів ЗБЗКЗ: 5, 84, 118 і 210. Ці штами ми вирощували на загальноприйнятому для культивування молюкутів рідкому поживному середовищі PPLO в умовах, описаних раніше [18, 20]. Одержані сиквенси 16S рРНК штамів ЗБЗКЗ порівнювали з сиквенсами 16S рРНК ахолеплазм та

інших молекулів, одержаних із баз даних Gen Bank, EPRO і EMBL у РДП (Ribosomal Database Project) (NAR, 1992, v.20, p. 2199–2200), і визначали відсотки гомології, використовуючи філогенетично аналізуючу програму Phylogenetic Analysis using Parsimony (PAUP), версію 3.1.1.

Клітини штамів ЗБЗКЗ одержували зі 100 мл вирощеної на рідкому поживному середовищі культури молекута шляхом її центрифугування протягом 15 хв при 14 000 g. Осад клітин відмивали буфером [0,28 M NaCl, 8,1 mM натрій фосфату, рН 7,4] і знову їх осаджували центрифугуванням при тих самих умовах та ресуспендували в лізуючому буфері [10 mM Тріс-НСІ (рН 8,3), 50 mM КСІ, 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Твін-20, 0,5% Трітон X-100, 60 мкг/мл протеїнази К] і суміш інкубували при 60°C протягом 1 год, потім прогрівали протягом 10 хв на киплячій водняній бані для інактивації протеїнази К та швидко охолоджували на льоду, розливали в пробірки Ependorf по 1 мл і зберігали при -20°C, використовуючи за необхідності як джерело геномної ДНК для ампліфікації генів 16S рРНК. Оптимізований метод ампліфікації 16S рРНК розроблений на підставі таких методів, які застосовуються в молекутології, але не завжди прийнятні до окремих її груп [24–28, 30–32]. Так, праймери *P1/P7*, які широко застосовують для ампліфікації генів 16S рРНК фітоплазм, не проявили універсальності, бо не ампліфікували генів 16S рРНК *Escherichia coli*.

Гени 16S рРНК ЗБЗКЗ ампліфікували з геномної ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовуючи універсальні (для усіх прокариотів) праймери *f D1* (сенсовий ланцюг нуклеотидів – форвард) і *rP1* (антисенсовий ланцюг нуклеотидів – реверс), комплементарних до ділянок, близьких до 5' і 3' кінців гена відповідно. Комбіноване використання цих праймерів дає можливість отримувати фрагменти, які вміщують понад 1500 п.н. [36–38].

Реактиви, які використовували в ПЛР, готували у вигляді 10-кратно концентрованих їх розчинів: сенсовий і антисенсовий праймери – 100 мкМ; *Tag* полімераза – 5 од./мкл; суміш чотирьох дезоксинуклеотид трифосфатів – кожного по 100 мМ; MgCl₂ – 25 мМ; ПЛР буфер (без MgCl₂) – 20-кратний розчин. Останні два реактиви змішували в рівних пропорціях. З цих розчинів, що зберігалися про запас у морозильнику при -20°C, готували 250,0 мкл преміксу для дослідів. До складу преміксу входили: 0,5 мкл (2,5 од) *Tag* полімерази; 50 мкл Н₂О; 50 мкл суміші нуклеотидів; 50 мкл сенсового праймера; 50 мкл антисенсового праймера; 50 мкл суміші ПЛР буферу з MgCl₂, концентрація останнього при цьому дорівнювала 12,5 мМ.

Оскільки кожна ПЛР відбувалася, як правило, в 40 мкл загального об'єму реагуючої суміші, то до 5 мкл одержаного, як описано вище, препарату з геномної ДНК додавали 15 мкл Н₂О і 20 мкл преміксу. ПЛР проводили в центрифужних пробірках Ependorf (0,5 мл) у програмованому автоматичному термоциклері (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler) в 35 циклів з такою періодичністю етапів: 2 хв при 95°C для денатурації ДНК; 1 хв при 58°C для оптимізації умов зв'язування праймерів з їхніми комплементарними послідовностями на матриці; 4 хв при 72°C для власне оптимальної ампліфікації ДНК *Tag* полімеразою; 10 хв при 72°C для подовження ланцюгів.

Одержаний генний продукт був розділений внаслідок електрофорезу в 1% агарозному гелі з етідієм бромідом, візуалізований, аналізований і клонований за допомогою клонуючих векторів *pCR=11* (Invitrogen) та *pGEM-4* (Promeda) та очищений на колонці Microcon 100 (Amicon).

ДНК-сиквенування проводили за методом Sanger *et al.* [29] при використанні Applied Biosystem 373A (Perkin Elmer Cetus) в обох напрямках, застосовуючи універсальні праймери, як це описано раніше [27, 28, 30–32, 36–38].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ. ВЛАСТИВОСТІ СИКВЕНСІВ 16S рРНК ЗБЗКЗ

Ампліфікація 16S рРНК та їх сиквенси показали, що сиквенси 16S рРНК усіх 4 штамів ЗБЗКЗ, які вивчалися, є тотожними і складаються для 16S рРНК кожного зі штамів з 1613 нуклеотидів, тоді як 16S рРНК типового штаму *Acholeplasma laidlawii* PG8 має 1508 нуклеотидів. Подібність (гомологія) між цими двома 16S рРНК сягає 86,9% або 1310 нуклеотидів.

Подібність сиквенсів 16S рРНК штамів ЗБЗКЗ з сиквенсами 16S рРНК інших молюсків така: *A. modicum* (1473 нуклеотиди) – 92%; *A. palmae* (1457 нуклеотидів) – 91,35%; з фрагментом 16S рРНК від 1 до 546 нуклеотида *A. axanthum* S-743 – 100%. Цей фрагмент був гомологічний ділянці 16S рРНК ЗБЗКЗ від 327 до 872 нуклеотида. Подібність сиквенсів 16S рРНК ЗБЗКЗ і *Mycoplasma fermentans* – 81%.

Порівняльний аналіз сиквенсів 16S рРНК штамів ЗБЗКЗ з сиквенсами 16S рРНК восьми фітоплазм дав змогу виявити гомологію, яка залежно від виду фітоплазми коливалася в межах від 80,0% до 87,1%. Гомологія сиквенсів 16S рРНК штамів ЗБЗКЗ і 16S рРНК такої класичної фітоплазми, як збудник жовтяниці айстр (1487 н.), становить 88,1%.

Згідно з рекомендаціями Міжнародного Комітету з Систематичної Бактеріології, процент подібності сиквенсів 16S рРНК нововиділених штамів зі сиквенсами 16S рРНК найближчих родичів має вкладатися у межі 70–100%, а значення вище 99% вже вказує на ідентичність видів [27, 28, 36–38]. Проте така умова не завжди відповідає дійсності. Так, сиквенси 16S рРНК *M. pneumoniae* і *M. genitalium* подібні на 98%, *A. frorum* і *A. entomophilum* – на 99,7%, але на підставі фенотипових ознак ці види залишаються дискретними [38]. Є і багато інших прикладів. Так, 16S рРНК *M. gallisepticum* і *M. imitans* відрізняються у своїх сиквенсах лише двома нуклеотидами, але всі інші фенотипові характеристики свідчать, що це різні види. Те ж саме стосується і підвидів *M. mycoides subsp. capri* і *M. mycoides subsp. mycoides*, сиквенси 16S рРНК яких відрізняються лише трьома нуклеотидами [27, 28, 36, 38]. Виходячи з постулату, що мова може йти про два різні види мікроорганізмів лише в тому випадку, якщо їх сиквенси 16S рРНК ідентичні менше ніж на 97%, ми приходимо до висновку, що ЗБЗКЗ є дискретним мікроорганізмом.

СЕРОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Серологічні властивості штамів ЗБЗКЗ були вивчені з застосуванням реакції пасивної гемаглютинації [1], зв'язування комплементу [2], подвійної дифузії в гелі за Оухтерлоні [15] та пригнічення росту [16]. Встановлено, що антигенний склад штамів ЗБЗКЗ характеризується значною кількістю антигенів і їх різноманітністю, що проявляється як у спільності, так і в гетерогенності серологічних властивостей і здатності реагувати майже гомологічно з сироватками до представників інших видів і навіть родин і, навпаки, сироватки, одержані до штамів ЗБЗКЗ, реагували таким самим чином з антигенами типових культур ахолеплазм і мікоплазм. Зокрема, майже гомологічні реакції спостерігали з антигенами *A. laidlawii*, *A. axanthum*, *A. modicum*, *A. oculi* і навіть з *Mycoplasma fermentans*, *M. gallinarum*, *M. salivarium* та іншими видами роду *Mycoplasma* і навпаки – сироватки до типових штамів цих видів майже гомологічно реагували з антигенами ЗБЗКЗ [1, 2, 15, 16].

Отже, на підставі досліджень серологічних властивостей штамів ЗБЗКЗ не можна однозначно стверджувати, що вони є ідентичними, принаймні хоча з одним із перелічених вище видів молюсків. Очевидно, що штами ЗБЗКЗ не можна ото-

тожнювати з жодним зі згаданих видів ахолеплазм, як би вони не були споріднені серологічно, бо їм властива чітка залежність від наявності в поживних середовищах стеринів або Твін-80, що є атипичним для ахолеплазм. Окрім того, розмір генома ЗБЗКЗ майже в півтора раза більший порівняно з розміром генома усіх відомих видів роду *Acholeplasma* [20].

Проте основні властивості ЗБЗКЗ однозначно свідчать, що він є все ж таки типовим представником класу *Mollicutes* [35].

КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА МОРФОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Усі штами ЗБЗКЗ, які вивчалися, задовільно росли при оптимальній температурі (32°C) на рідких, напіврідких (0,3% агар-агару) і твердих (1,2% агар-агару) живильних середовищах [18, 20] з 10%-ної сироватки крові коня або від 1,0 % мкг/мл до 20 мкг/мл холестерину, утворюючи на твердих середовищах на 3–5 добу типові для молікутів колонії діаметром 1,0–1,5 мм за морфологією подібні до „вилливної яєчні” з ростом у центрі і поверхневою периферією. ЗБЗКЗ – факультативний анаероб з оптимумом рН для росту в межах 7,0–7,5. Ріст спостерігали в межах від 20°C до 40°C з оптимумом при 32°C, для штаму 118 – від 32°C до 37°C. Клітини ЗБЗКЗ не мають справжньої клітинної стінки, а обмежені лише одинарною тришаровою мембраною і не ревертують до бактеріальної клітини протягом п'яти пересівів на середовищах, з яких виключені інгібітори бактеріального росту (пеніцилін, ацетат талію). Щодо культури тканин КВ та курячих фібробластів [10] штами ЗБЗКЗ ведуть себе як справжні молікути: L-форми не здатні до репродукції в культурах таких клітин, а молікути, в т.ч. і ЗБЗКЗ, активно в них розмножуються і обумовлюють деструктивні зміни: зменшення розміру клітин культури і збільшення ядер, розповзання і руйнування їх моношару, починаючи з центру, появу по периферії кетягоподібних скупчень клітин, які дегенерують, зморщуються, в них з'являються зернисті структури, і культура клітин повністю гине. Клітини мають розмір від 300 до 1000 нм, плеоморфні, овоїдної або коковидної форми, здатні утворювати невеликі ланцюжки, вільно проходять крізь мембранні фільтри з отворами розміром 450 і навіть 220 нм, але кількість клітин, які проходять крізь фільтр з останнім вказаним розміром пор, зменшуються у 5–6 разів. Клітини ЗБЗКЗ не фільтруються крізь мембранні фільтри з отворами в 100 нм, стійкі до ацетату талію (0,125 г/л), пеніциліну в концентраціях у середовищі від 1 000 до 10 000 мкг/мл, абсолютно чутливі до тетрациклінових антибіотиків, на напіврідких середовищах виживають до 60 діб при 4°C. Штами ЗБЗКЗ здатні синтезувати каротиноїди типу нейроспорину в кількостях, які можна виявити спектрофотометрично, з не менш ніж сімома ненасиченими зв'язками в політерпенових ланцюгах і з трьома піками в діапазоні хвиль від 416±5 до 465±5 нм [12]. Ми вважаємо, що здатність до каротиногенезу, яка у ЗБЗКЗ перебуває у зародковому стані, повного розквіту досягла у *A. laidlawii*.

БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Штами ЗБЗКЗ проявляють активний хемотаксис щодо поживних речовин [17]: активно катаболізують глюкозу, не засвоюють манози, галактози, рамнози, сахарози, фруктози, мальтози, галактози, ксилози, арабінози, лактози, цитруліну, серину, валіну, L-треоніну, тирозину, сечовини, телуріту, гідролізують ескулін, редукують тетразолій. Мінімальні концентрації антибіотиків, які пригнічують ріст штамів ЗБЗКЗ, становлять: тетрацикліну – 1,0 мкг/мл; рондоміцину – 2,0 мкг/мл; неоміцину –

4,0 мкг/мл; налідіксової кислоти – 50,0 мкг/мл; α -аманітину 2,0–5,0 мкг/мл. Штами ЗБЗКЗ утворюють L-лейцинамінопептидазу, протеолітичні ферменти, РНК-ази і ДНК-ази, не утворюють каталази, аргініндеамінази, оксидази і цитохромоксидази, не редукують метиленового голубого [14, 19]. У штамів ЗБЗКЗ оксиредуктази локалізовані в мембрані, там же локалізовані NADH-дегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа і лужна фосфатаза [4, 5, 6]. Усі вони локалізовані у внутрішньому шарі цитоплазматичної мембрани. Кисла фосфатаза локалізована в цитоплазмі [4]. За вмістом пальмітинової, стеаринової кислот і сумою ненасичених жирних кислот штами ЗБЗКЗ займають проміжне положення між штамми *A. laidlawii* і *A. axanthum* [8]. У штамі ЗБЗКЗ функціонують дві форми ДНК-залежної РНК-полімерази [11], вони здатні продукувати в навколишнє середовище фруктозо-1,6-бісфосфатазу, яка, на думку авторів, є фактором їх патогенності. Завдяки функціонуванню цього ферменту в рослинах, у їх хлоропластах накопичується крохмаль, внаслідок чого вони руйнуються, а рослини стають хлоротичними, „жовтяничними” [19, 21, 22]. Штами ЗБЗКЗ у складі вуглеводів глікокаліксу мають N-ацетилнейрамінову кислоту як кінцевий цукор [19].

ВІДНОШЕННЯ ДО НАЯВНОСТІ СТЕРИНІВ У СЕРЕДОВИЩІ

Визначено, що штами ЗБЗКЗ своїм відношенням до наявності в живильних середовищах стеринів займають проміжне положення між справжніми стеринзалежними і стериннезалежними молікутами [13], будучи своєрідною перехідною формою між різними родами в класі *Mollicutes*. Вони не чутливі до дії дігітоніну і поліанетолсульфонату. Ці дані перевірені за допомогою застосування стандартного методу визначення стеринзалежності молікутів [33, 34] і встановлено [20], що штами ЗБЗКЗ, на відміну від *A. laidlawii*, дуже неохоче росли на середовищах без сироватки і холестерину і жваво реагували на внесення в бульйон PPLO мінімальних кількостей холестерину або 0,01% Твін-80 (поліоксиетилен сорбітану) та росли досить активно. *A. laidlawii* майже з однаковою інтенсивністю росла як на середовищах зі стеринами, кінською сироваткою та Твін-80, так і без цих компонентів.

Твін-80 не підтримував росту типового стеринзалежного виду молікутів *Spiroplasma citri* [20].

Те, що у штамів ЗБЗКЗ на середовищах без стеринів все-таки спостерігається незначний ріст, можна пояснити їх здатністю синтезувати каротиноїди, які функціонально замінюють стерини в мембранах цих молікутів. Своїм відношенням до стеринів штами ЗБЗКЗ чітко відрізняються від класичних ахлеоплазм і займають проміжне положення між ними, ентомоплазмами і мезоплазмами [35].

ГЕНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Розмір генома визначений за допомогою пульс-електрофорезу, у штамів ЗБЗКЗ перебуває в межах від 2200 т.п.н. (штам 84) до 2310 т.п.н. (штам 118) [20]. Вміст основ гуаніну+цитозину в геномі ЗБЗКЗ, визначений за допомогою високоефективної рідинної хроматографії, становить 28,1 моль%.

ПАТОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ

Патогенні властивості збудника блідо-зеленої карликовості зернових були доведені трьома способами: 1) подрібнення інфікованих природно комах-переносників

з подальшою екстракцією їх гемолімфи й інфікування нею (уколом) неінфікованих осіб цикадок та наступне їх живлення на здорових рослинах пшениці [3]; 2) штучне інфікування чистою культурою ЗБЗКЗ неінфікованих комах-переносників і наступне їх живлення на здорових рослинах пшениці; 3) пряме субепідермальне введення чистої культури ЗБЗКЗ у здорові рослини пшениці [7]. У всіх випадках на інфікованих рослинах були відтворені ознаки хвороби, типові для блідо-зеленої карликовості зернових, включаючи хлороз, карликовість, надмірне кущування та виродження колосків. При цьому у комах-переносників цієї хвороби цикадок *Psammotettix striatus* L. і *Macrostelles laevis* Rib., штучно інфікованих чистою культурою ЗБЗКЗ, спостерігали „ефект процвітання”: вони довше жили порівняно з контрольними неінфікованими комахами, а їх плодючість (кількість відкладених яєць) збільшувалась у кілька разів.

ЗБЗКЗ фітопатогенний щодо зернових (*Graminearum*) культур. Особливо чутливі до цього захворювання представники роду *Triticum*, помірно стійкими є представники роду *Triticale* і стійкими – роду *Secale*.

УМОВИ ПРОЖИВАННЯ

Поширення і перебування у природі збудника блідо-зеленої карликовості зернових специфічно пов'язане з цикадками *Psammotettix striatus* L. і *Macrostelles laevis* Rib. та злаковими бур'янами, на яких вони живляться. З бур'янів ці комахи переносять ЗБЗКЗ на культурні рослини родини *Graminearum*. Коло рослин, в яких може існувати ЗБЗКЗ, визначається. Ймовірно, ті їх види, на яких живляться цикадки, щодо рослин є поліфагами.

ТАКСОНОМІЧНЕ ЗАКЛЮЧЕННЯ

Вище ми навели специфічні властивості штамів ЗБЗКЗ, одержані при виконанні вимог Підкомітету з таксономії молікутів Міжнародного Комітету з Систематичної Бактеріології (IJSB. 1995. V.45. № 3. P.605–612) відносно описів нових таксономічних одиниць класу *Mollicutes*. На підставі властивостей ЗБЗКЗ, описаних тут і в інших джерелах [1–22]: відсутність клітинної стінки та нездатність клітин ревертувати у справжню бактеріальну клітину з ригідною клітинною стінкою при рості на середовищах без антибіотиків і їх здатність проходити крізь мембранні фільтри з отворами від 220 до 450 нм, стійкість до пеніциліну і ріст на твердих середовищах у вигляді колоній типу „вилівної яєчні” з ростом у шар середовища центром і поверхневою периферією – дає можливість віднести цей мікроорганізм до класу *Mollicutes*. Здатність штамів ЗБЗКЗ утворювати каротиноїди, рости за відсутності в живильних середовищах холестерину або сироватки крові тварин, відсутність строгого анаеробіозу та спіралевидності в клітинах вказує на те, що вони можуть бути віднесені до порядку III *Acholeplasmatales*, родини I *Acholeplasmataceae* [35]. На це вказує локалізація в мембрані NADH-дегідрогенази та велика серологічна спорідненість з такими представниками єдиного для цієї родини роду I *Acholeplasma*, як *A. laidlawii*, *A. axanthum*, *A. modicum* і *A. oculi*, що може свідчити про велику різноманітність у штамів ЗБЗКЗ поверхневих антигенів, їх варіабельність і пластичність, що забезпечується (якщо врахувати розмір геному і своєрідність системи його транскрипції) багатьма регуляторними механізмами, фазовими варіаціями в експресії та поверхневою презентацією або маскуванням епітопів. При цьому треба мати на увазі, що домінуючими антигенами молікутів є мембранні ліпопротеїни, яким властиві

значна варіабельність і високий темп мінливості. Проте такі властивості, як розмір геному, наявність двох ДНК-залежних РНК-полімераз, здатність утворювати позаклітинну фруктозо-1,6-бісфосфатазу, з чітко вираженою фітопатогенністю та високою генетичною спорідненістю з представниками роду *Phytoplasma* за сиквенсами 16S рРНК, – ще не дають підстави відносити штами ЗБЗКЗ до цього єдиного роду *Acholeplasma* родини *Acholeplasmataceae*.

Те, що штами ЗБЗКЗ мають велику генетичну подібність і спорідненість із видами родів *Acholeplasma* і *Phytoplasma*, а також мають окремі елементи фізіологічної подібності з представниками родів *Entomoplasma* і *Mesoplasma* і навіть роду *Mycoplasma* (напр., серологічна спорідненість з *M. fermentans* та ін.) свідчить про те, що штами ЗБЗКЗ є представниками нового роду, який є ймовірним еволюційним попередником перелічених родів (принаймні родів *Acholeplasma* і *Phytoplasma*) і перехідною формою, своєрідною ланкою, мікроорганізму від кластридальної гілки бактерій до молікутів, чим підтверджується здогад Lim і Sears [26] про те, що анаероплазми, ахолеплазми і фітоплазми, ймовірно, мають спільне походження, бо дуже філогенетично споріднені.

А тому ми вважаємо, що для успішної класифікації штамів ЗБЗКЗ, зважаючи на множинність їх властивостей, слід запровадити принаймні новий рід II *Pluraplasma gen. nov.* у межах родини *Acholeplasmataceae*, представником якого є поки що єдиний новий вид *Pluraplasma granulum sp. nov.*, названий так у зв'язку з тим, що він серед злакових культур найбільше спеціалізований до зернових і вперше ізольований із цих рослин.

З часом, можливо, для роду *Pluraplasma* буде запроваджено нову родину, бо за своїми фундаментальними фенотиповими і генетичними ознаками він з великими застереженнями вписується в родину *Acholeplasmataceae*.

Таксономічний опис, наведений нижче, підсумовує властивості роду *Pluraplasma gen. nov.* і його представника *Pluraplasma granulum sp. nov.*

ОПИС РОДУ *PLURAPLASMA GRANULUM SP.NOV.*

За клітинною морфологією та розміром штами 5, 84, 118 і 210 нового роду *Pluraplasma* – це, як правило, представлені не спіральними клітинами, не рухливими, плеоморфними, кокоїдними або овальної форми розміром від 300 до 1000 нм у діаметрі, серед яких трапляються короткі ланцюги та ниткоподібні утворення. Клітини обмежені одинарною тришаровою мембраною і не мають жодних елементів клітинної стінки, проходять крізь мембранні фільтри з середнім розміром отворів у них від 220 до 450 нм і не проходять крізь фільтри з отворами 100 нм. Факультативний анаероб, здатний рости на глибині 3–5 мм від поверхні напіврідкого (0,3% агар-агару) поживного середовища. Колонії на твердому поживному середовищі, яке містило 1,3% агар-агару, мають форму „виливної яєчні”. Мікроорганізм задовільно росте на багатих поживними речовинами середовищах. Таким є середовище СМ ІМВ-72, на яке він вперше і був виділений у культуру [18]. Організм – чітко виражений хемоорганотроф, його ріст певною мірою залежить від наявності в середовищах стеринів, але здатний рости і без цих речовин, утворюючи каротиноїди. На середовищах без стеринів ріст незначний, але при внесенні в нього 0,1% Твін-80 (поліоксилтилен сорбітану) стає таким же інтенсивним, як і на середовищах зі стеринами чи сироваткою крові тварин [20].

Оптимальна температура для росту 32°C, а ріст спостерігають у межах від 10°C до 40°C.

Залежно від штаму розмір генома коливається від 2200 до 2310 т.п.н. з вмістом основ гуаніну і цитозину близько 28,1 моль% при визначенні за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (HPLC). У серологічному відношенні практично не відрізняється від усіх відомих стеринзалежних видів молікутів. Має з ними велику подібність у сиквенсах 16S рРНК, але не ідентичний з ними за цим показником. Оптимальне рН для росту перебуває в межах 7,2–7,5. Утворює кислоти з глюкози, але не з манози; гідролізує ескулін, але не аргінін; редукує тетразолій; має L-лейцин амінопептидазу; лужну і кислу фосфатази, проявляє протеолітичну активність; нечутливий до дігітоніну і до поліанетолсульфату.

ОПИС *PLURAPLASMA GRANULUM SP. NOV.*

Pluraplasma granulum має всі властивості свого роду, описані вище. Патогенний щодо родини *Gramineae*, викликаючи у них захворювання на „жовтяницю”, яку названо блідо-зеленою карликовістю зернових, перебуває у симбіотичних зв'язках зі спеціалізованими до нього цикадками-переносниками *Psammotettix striatus* L. і *Macrostoteles laevis* Rib. NADH-дегідрогеназа, сукцинатдегідрогеназа, лужна фосфатаза, оксиредуктази локалізовані в мембрані. Проявляє протеолітичну активність, утворює L-лейцинпептидазу, синтезує каротиноїди, катаболізує глюкозу, але не манозу, гідролізує ескулін, редукує тетразолій, але не метиленовий голубий. Кисла фосфатаза локалізована в цитоплазмі, а лужна – в мембрані. Має дві форми ДНК-залежної РНК-полімерази, які відрізняються за хроматографічними властивостями, поліпептидним складом, умовами регуляції. Як і його вірогідний філогенетичний предок, бактерія *Bacillus subtilis* позаклітинно продукує фруктозо-1,6-бісфосфатазу яка, можливо, є одним з основних факторів патогенності фітоплазм. Завдяки функціонуванню молікутної фруктозобісфосфатази в клітинах рослин порушується регуляція процесів фотосинтезу, в хлоропластах накопичується надмірна кількість крохмалю, що призводить до їх руйнування і пожовтіння листків. Рослини набувають типових ознак „жовтяниці”.

Основи Г+Ц в ДНК становлять 28,1 моль%. Геном має розмір від 2200 до 2310 т.п.н. Типовий штам 118.

1. Малиновская Л.П., Скрипаль И.Г. Антигенные взаимоотношения микоплазм растений в реакции пассивной гемаглютинации. **Микробиол. журнал**, 1983; 45 (2): 79–84.
2. Малиновская Л.П., Скрипаль И.Г. Изучение фитопатогенных микоплазм в реакции связывания комплемента. **Микробиол. журнал**, 1984; 46 (5): 58–64.
3. Онищенко А.Н. Влияние различных факторов на инкубационный период фитопатогенных микоплазм в растениях и цикадках-переносчиках. **Микробиол. журнал**, 1984; 46 (5): 52–52.
4. Онищенко А.Н., Колесник Л.В., Слободяник В.В., Скрипаль И.Г. Локализация фосфатаз в клетках фитопатогенных молликутов. **Микробиол. журнал**, 1992; 54 (3): 19–23.
5. Онищенко А.Н., Малиновская Л.П., Токовенко И.П. Электронно-цитохимическое изучение локализации NADH-дегидрогеназы и сукцинатдегидрогеназы у ахлеплазм – возбудителей желтух растений. **Микробиол. журнал**, 1992; 54 (1): 46–51.
6. Онищенко А.Н., Слободяник В.В., Колесник Л.В., Скрипаль И.Г. Локализация оксиредуктаз в клетках фитопатогенных молликутов. **Микробиол. журнал**, 1992; 54 (4): 27–33.

7. Онищенко А.М., Скрипаль І.Г., Торяник Н.В., Малиновська Л.П. Патогенні властивості мікоплазми-збудника блідо-зеленої карликовості зернових. **Мікробіол. журнал**, 1977; 39 (5): 621–626.
8. Панченко Л.П., Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Жирнокислотный состав фитопатогенных микоплазм. **Мікробіол. журнал**, 1987; 49 (2): 63–68.
9. Панченко Л.П., Скрипаль І.Г. Нуклеотидный состав ДНК фитопатогенных микоплазм. **Мікробіол. журнал**, 1991; 53 (1): 79–82.
10. Прозоровский С.В., Левина Г.А. Сравнительный анализ поведения L-форм бактерий и микоплазм в клеточных культурах. **Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии**, 1973; 1: 82.
11. Скрипаль І.Г., Бабичев В.В. Молекулярные свойства и субъединичная структура ДНК-зависимых и РНК-полимераз микоплазмы-возбудителя бледно-зеленой карликовости пшеницы. **Мікробіол. журнал**, 1983; 45 (6): 64–71.
12. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Каротиногенез у фитопатогенных микоплазм. **Мікробіол. журнал**, 1983; 45 (6): 71–76.
13. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Стеринзависимость фитопатогенных микоплазм. **Мікробіол. журнал**, 1983; 45 (5): 66–70.
14. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П., Токовенко Л.П., Слободяник В.В. Физиолого-биохимические свойства микоплазм-возбудителей желтух растений. **Мікробіол. журнал**, 1988; 50 (4): 34–38.
15. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Антигенные особенности фитопатогенных микоплазм, выявляемые в реакции иммунопреципитации в геле. **Мікробіол. журнал**, 1989; 51 (1): 29–36.
16. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Изучение фитопатогенных микоплазм, вызывающих желтухи разных растений при помощи реакции ингибирования роста. **Мікробіол. журнал**, 1989; 51 (1): 25–29.
17. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П., Онищенко А.Н. Динамика и культурально-физиологические основы образования фитопатогенными микоплазмами колоний типа „яичница-глазунья”. **Мікробіол. журнал**, 1983; 45 (4): 52–57.
18. Скрипаль І.Г., Малиновская Л.П. Среда СМ ИМВ-72 для выделения и культивирования фитопатогенных микоплазм. **Мікробіол. журнал**, 1984; 46 (2): 71–75.
19. Скрипаль І.Г., Онищенко А.М., Малиновська Л.П. та ін. Деякі фенотипові ознаки молікүтів, як їх можливі філогенетичні маркери. **Мікробіол. журнал**, 1995; 57 (3): 3–8.
20. Скрипаль І.Г., Егоров О.В. О природе возбудителя бледно-зеленой карликовости зерновых. **Мікробіол. журнал**, 2006; 68 (2): 22–29.
21. Скрипаль І.Г., Токовенко І.П., Малиновська Л.П. Спосіб одержання позаклітинної фруктозо-1,6-бісфосфатази – основного фактора патогенності фітоплазм (на моделі збудника блідо-зеленої карликовості зернових культур). **Мікробіол. журнал**, 2004; 66 (3): 89–97.
22. Скрипаль І.Г., Малиновська Л.П., Токовенко Л.П. Молекулярна маса і субодичний склад позаклітинної фруктозобісфосфатази *Acholeplasma laidlawii* var. *granulum* штам 118. **Мікробіол. журнал**, 2005; 67 (6): 73–78.
23. Gawel N.J., Jarret R.L. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *ipomea*. **Plant Mol. Biol. Rep**, 1991; 9: 262–266.
24. Knox Ch.L., Giffard Ph., Timms P. The phylogeny of *Ureaplasma urealiticum* of the *mba* gene fragment. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 1988; 48: 1323–1331.
25. Lee J.-M., Gundersen-Rindal D.E., Davis R.E., Bartoszyk I.M. Revised classification scheme of phytoplasmas based of RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 1998; 48: 1153–1169.

26. *Lim P.O., Sears B.B.* Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. **J. Bacteriol**, 1992; 174 (8): 2006–2011.
27. *Pettersson B., Uhlen M., Johansson K.-E.* Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 1996; 46 (4): 1093–1098.
28. *Rawadi G., Dujeancourt-Herry A., Lemereier B., Roulland-Dussoix D.* Phylogenetic position of rare human mycoplasmas, *Mycoplasma faucium*, *M. buccale*, *M. primateum* and *M. spermatophilum*, based on 16S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 1998; 48: 305–309.
29. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1977; 74: 5463–5467.
30. *Schneider B., Ahrens U., Kirkpatrick B.C., Seemüller E.* Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rRNA. **J. Gen. Microbiol**, 1993; 139 (3): 519–527.
31. *Schneider B., Seemüller E., Smarf C.D., Kirkpatrick B.C.* Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms of phytoplasmas. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology** (S.Razin, J.G.Tully e.a.), 1995; 1: 369–380.
32. *Seemüller E., Schneider B., Maurer R. e.a.* Phylogenetic classification of phytopathogenic *Mollicutes* by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. **Int. J. Syst. Bacteriol**, 1994; 44 (3): 440–446.
33. *Tully J.G.* Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement. **Method in Mycoplasmaology** (S.Razin, J.G.Tully e.a.), 1983; 1: 355–362.
34. *Tully J.G.* Determination of cholesterol and polyoxyethylene sorbitan growth requirements of *Mollicutes*. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology** (S.Razin, J.G.Tully e.a.), 1995; 1: 381–389.
35. *Tully J.G., Bove J.M., Laigret F., Whitcomb R.F.* Revised taxonomy of the class *Mollicutes*: Proposed elevation of monophyletic cluster of arthropod-associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.) with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended description of the order *Mycoplasmatatales*, family *Mycoplasmatataceae*. **Int. J. Syst. Bact**, 1993; 43 (2): 378–385.
36. *Weisburg W.G.* Ribosomal RNA sequencing and construction of mycoplasma phylogenies. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology** (S.Razin, J.G.Tully e.a.), 1995; 1: 349–354.
37. *Weisburg W.G.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol**, 1991; 173 (2): 697–703.
38. *Weisburg W.G., Tully J.G., Rose D.L. e.a.* A phylogenetic analysis of the mycoplasmas basis for their classification. **J. Bacteriol**, 1989; 171 (12): 6455–6467.

Одержано: 22.12.2006