

ІНСТИТУТ АГРОЕКОЛОГІЇ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ НААН

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
«ДІАГНОСТИКА ТА ПРОФІЛАКТИКА ВІРУСІВ РОДУ
***TOBAMOVIRUS* НА ОСНОВІ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ»**

КИЇВ 2020

Методичні рекомендації розроблені відповідно до науково-технічної програми «Агроекологія» (ДР № 0116V002330) в межах завдання 06.00.03.03 Ф. «Оцінка стійкості сільськогосподарських культур задіяних у селекційно-генетичних, біотехнологічних процесах до ізолятів ВТМ (*Tobamovirus*) та присвячені основним властивостям вірусів роду *Tobamovirus*, що циркулюють в агроценозах України, діагностиці та профілактиці вірусним інфекцій агроценозів.

Методичні рекомендації розраховано на аспірантів, студентів, вірусологів, екологів, спеціалістів виробництва.

Рекомендації розглянуто та рекомендовано Вченою радою Інституту агроекології і природокористування НААН, протокол № 8 від 25 вересня 2020 року.

Рекомендації підготували: к.б.н. Цвігун В.О., д.б.н., проф., академік НААН Бойко А.Л.

ЗМІСТ

	стор.
Вступ	5
ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ РОДУ <i>TOBAMOVIRUS</i>	7
<i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i>	7
<i>Tomato mosaic virus (ToMV)</i>	10
<i>Pepper mild mottle virus (PMMoV)</i>	11
<i>Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)</i>	14
МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСІВ РОСЛИН	17
Підготовка зразків для аналізу	17
Культивування вірусів рослин	19
Імуноферментний аналіз (ІФА)	21
Постановка прямого імуноферментного аналізу	21
Постановка непрямого імуноферментного аналізу	22
Імуноферментний аналіз в модифікації «сандвіч»	24
Статистична обробка результатів	25
Методика оцінки ступеню патогенності ізолятів ВТМ у різних сортах сільськогосподарських культур	25
Профілактика та оздоровлення сільськогосподарських культур методом мікрогравітації	26
Ключ-схема оцінки шкодочинності ВТМ на різних сільськогосподарських культурах	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	29
ДОДАТОК	30

Перелік умовних скорочень

АГ – антиген

АС – антисироватка

АТ – антитіло

(К-) – негативний контроль

(К+) – позитивний контроль

(*TMV*) – *Tobacco mosaic virus* (вірус тютюнової мозаїки)

(*ToMV*) – *Tomato mosaic virus* (вірус мозаїки томату)

(*PMMoV*) – *Pepper mild mottle virus*

(*CGMM*) – *Cucumber green mottle mosaic virus* (вірус зеленої крапчастості мозаїки огірка)

ІФА – імуноферментний аналіз

ПЛР – полімеразноланцюгова реакція

РНК – рибонуклеїнова кислота

PBS – phosphate buffer solution (фосфатний буферний розчин)

ICTV – International Committee for Taxonomy of Viruses (Міжнародний комітет з таксономії вірусів)

ВСТУП

З часу відкриття вірусів минуло понад 100 років. Сьогодні описано тисячі вірусів, що спричиняють захворювання практично в усіх організмів – представників еукаріотів та прокаріотів. Загальним поняттям «вірус» об'єднують велику групу біологічно активних структур.

Вони є повноправними представниками різноманіття живого світу і невід'ємною частиною біоценозів. Загальноприйнято вважати, що віруси не лише різноманітні, а й численні. У вільній акваторії Світового океану їхня кількість сягає 10^{31} , що робить їх найбільшим джерелом генів на Планеті.

Значну увагу дослідники приділяють екології вірусів з огляду на забруднення довкілля промисловими відходами. Віруси поширені в усіх типах екологічних ніш – аеробних й анаеробних, оліготрофних та еутрофних, комфортних і таких, що спричиняють фізіологічний стрес, зокрема, й нішах, для яких характерні екстремальні значення температури, солоності, рН і гідростатичного тиску. Віруси відіграють важливу роль інфекційній патології рослин, спричиняє значні економічні збитки.

Віруси – неклітинна форма життя. Навіть сьогодні, у час прогресу біології, їхнє походження і сенс існування не з'ясовані. Віруси – це не просто органічні структури або мікроскопічні живі істоти, які можна побачити лише за допомогою електронного мікроскопа.

Вірусні захворювання є одним з основних обмежуючих факторів у вирощуванні якісної сільськогосподарської продукції. Еволюційно-популяційні процеси, особливо під впливом антропогенних та геліокосмічних факторів, сприяють збільшенню кількості штамів вірусів, що інфікують культурні рослини та ведуть до збільшення їх епіфітотій. На сьогоднішній день міжнародним комітетом з таксономії вірусів (International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV) зареєстровано 1000 видів вірусів що уражують рослини.

Постійне зростання та введення новітніх технологій, глобальне потепління та поширення векторів, а також швидкий обмін насіннєвим та посадковим

матеріалом між різними регіонами земної кулі, сприяють поширенню та утворенню нових вірусних інфекцій, що вражають не лише цільові культури, але й інші рослини.

Діагностика вірусів є однією з важливих завдань у загальній системі захисних заходів. При цьому методи, які застосовують в ранній діагностиці фітовірусів, мають бути специфічними, чутливими, легко відтворюваними, придатними для проведення масових аналізів, а також дозволяти виявляти віруси в процесі отногенезу рослин за різних умов довкілля.

Віруси спричиняють різні патологічні зміни в рослин. Такі віруси називають фітопатогенними. Незважаючи на те, що першими було відкрито саме фітопатогенні віруси, вони менш досліджені порівняно з вірусами мікроорганізмів чи савців. Проблемою під час роботи з вірусами рослин є дуже низька ефективність методів інокуляції клітин. Більшість вірусів рослин можуть передаватися механічною інокуляцією, це значення в перерахунку на одну клітину наводять як 1:1000000.

Геном фітопатогенних вірусів представлений ДНК (одно ланцюгова або дволанцюгова, лінійна або замкнена в кільце), або РНК, яка може бути одно- або дво- ланцюговою. У деяких вірусів РНК сегментована.

Фітопатогенні віруси проникають у рослинні клітини внаслідок пошкодження листків, стебел і коренів. Кількісне визначення фітопатогенних вірусів ґрунтується на обчисленні кількості некрозів, які з'являються в тих місцях, де простежувалися первинні пошкодження.

У природних умовах поширення фітопатогенних вірусів відбувається внаслідок прямого контакту між рослинами, через переносників, вегетативно, насінням і пилком. Передаванню вірусів сприяють також рослини-паразити, що створюють прямий зв'язок між рослинами через систему своїх провідних пучків (ксилему чи флоему), якими можуть поширюватися віруси.

Вірусна інфекція вражає різні частини рослини. Найчастіше спостерігають зміни в забарвленні (пожовтіння, хлорози), відмирання тканин (некрози) або деформації. Симптоми захворювань рослин, інфікованих вірусом, можуть бути

різноманітними і залежать від рослин-хазяїна, тривалості інфекції, штаму вірусу і зовнішніх умов.

Віруси відрізняються за здатністю інфікувати різні рослини; кількість видів сприйнятливих рослин (господарів) варіює для різних вірусів. Як наприклад – рател-вірус тютюну, що вражає понад 400 різних видів рослин, які належать до 50 родин та вірус крапчастості бобів квасолі, до якого чутливі тільки бобові. Більшість добре вивчених вірусів уражає в середньому 30 різних видів рослин. Невідомо, які чинники визначають коло господарів кожного вірусу. Зазвичай, вірус, уражаючи той чи інший вид рослин, є інфекційним і для інших видів того ж роду, проте неможливо передбачити, які інші види і роди рослин будуть чутливими до цього вірусу. Коло господарів вірусу і симптоми, що ним зумовлені, характерні для цього вірусу, разом з іншими ознаками використовують для ідентифікації вірусів.

Для більшості фітопатогенних вірусів характерне системне ураження їхніх господарів (тобто вірус переміщається від місця проникнення в інші частини рослини), хоча не обов'язково враження зазнають усі клітини і тканини. Поселившись у рослині вірус зазвичай, наявний у ній аж до її загибелі, і під час вегетативного розмноження передається потомству.

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСІВ РОДУ *TOBAMOVIRUS*

***Tobacco mosaic virus* (TMV)**

Tobacco mosaic virus (TMV) був визнаний як модель, яка дозволяє висвітлити основні характеристики та властивості, які притаманні вірусу. Даний вірус додатково став прототиповою моделлю для дослідження біології рослин-господарів.

Tobacco mosaic virus належить до роду *Tobamovirus*. TMV є унікальним у багатьох відношеннях. Він був першим з відкритих вірусів, першим його було виділено в чистому вигляді і кристалізовано, на ньому вперше було відкрито існування субодиниць і показано, що інфекційність вірусу пов'язана тільки з нуклеїновою кислотою. Зрештою саме TMV вперше розділено на білок та

інфекційну РНК і знову ж відтворено вірус із цих же компонентів. TMV є першим вірусом, в якому розшифровано послідовність амінокислотних залишків у пептидному ланцюзі білкової молекули. За сучасними даними, TMV має форму порожнього циліндра діаметром 15 нм і завдовжки 300 нм. Віріон ВТМ містить одноланцюгову (+) РНК, його капсид складається з однакових, спіральних розміщених білкових субодиниць. У кожній спіралі на три витки припадає 29 субодиниць, кожна з яких є білковою молекулою з молекулярною масою 17 530. Загалом віріон містить 2130 ($\pm 2\%$) ідентичних білкових субодиниць.

Фізико-хімічні властивості вірусу: плавуча густина в CsCl дорівнює 1.325 г/см^3 , частки легко руйнуються в присутності нейтральних солей хлоридів і додецилсульфату натрію. Основний з S_{20W} – 194 S. Ізоелектрична точка знаходиться в межах рН 3.5. Температурна точка інактивації вірусу в соці при нагріванні протягом 10 хвилин становить 90°C (рис. 1).

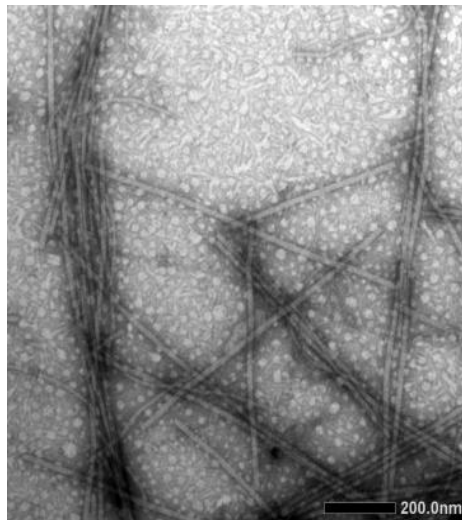


Рис. 1-Електронномікроскопічне зображення *Tobacco mosaic virus*

TMV має широкий діапазон рослин-господарів, серед 199 представників 30 родин. Експериментальні рослини-господарі: *Nicotiana tabacum* cvs. *Turkish*, *Turkish Samsun*, *Samsun (Samsoun)*, *White Burley*, *Burley and Xanthi*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Phaseolus vulgaris*. Експериментальні нечутливі рослини: *Allium porrum*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana megalosiphon*. Передача векторами

(*Myzus ascalonicus*) неперсистентна. Симптомами на рослинах є скрученість та карликовість листя та рослини вцілому, мозаїчне забарвлення листків (рис. 2, 3).



Рис. 2-Зовнішній вигляд листя перцю овочевого ураженого TMV.



Рис. 3-Зовнішній вигляд листя перцю овочевого ураженого TMV.

Цитопатологія: вірус знаходиться в усіх частинах хворої рослини. В цитоплазмі клітин спостерігаються кристалічні включення у вигляді голок та волокон, що являють собою скупчення вірусних часточок. Також, наявні аморфні “Х-тільця”.

Tomato mosaic virus (ToMV)

Вірус відноситься до роду *Tobamovirus*. Віріони мають форму паличок 300 нм довжиною, 18 нм шириною (рис. 4). Вірус простий, містить 5% нуклеїнової кислоти, 95% білку, 0% ліпідів. Геном представлений одноланцюговою лінійною РНК. Нуклеїнова кислота вірусу кодує 4 білки, серед яких 3 – ферменти, а один – білок оболонки.

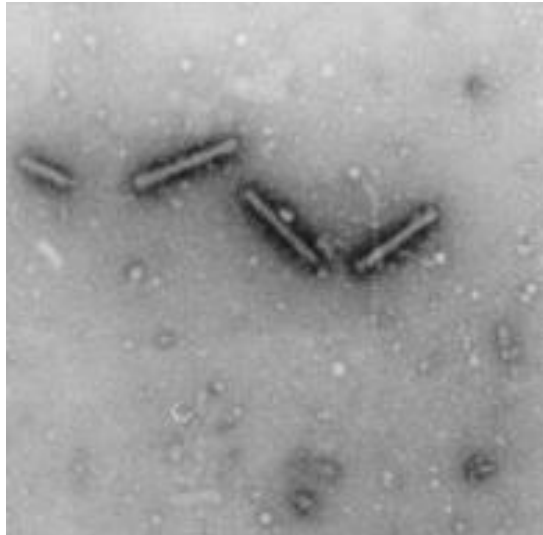


Рис. 4-Морфологія *Tomato mosaic virus*.

Фізико-хімічні властивості ToMV: плавуча густина в CsCl дорівнює 1.33г/см^3 , частки легко руйнуються в присутності нейтральних солей хлоридів і додецилсульфату натрію. Коефіцієнт седиментації 190 S. Ізоелектрична точка знаходиться в межах рН 4.5 - 4.6. Температурна точка інактивації вірусу в соці при нагріванні протягом 10 хвилин становить $55-70^\circ\text{C}$. Життєздатність вірусу *in vitro* становить 1-10 днів.

Цитопаталогія: вірусні частки збираються і розсіяно накопичуються в цитоплазмі; іноді присутні також в ядрі і в вакуолях, утворюючи кристали та аморфні “Х-тільця” .

ToMV має широке різноманіття господарів, він був виявлений в рослинах, ґрунті, воді. Через свою стабільність і поширеність у навколишньому середовищі, було припущено, що вірус міг зберігатися ще у стародавніх

льодовиках. Даний вірус має широкий діапазон рослин-господарів. Експериментальні рослини-господарі: *Capsicum annuum*, *Petunia x hybrida* c, *Nicotiana tabacum*, *Solanum giganteum*. Експериментальні нечутливі рослини: *Cucumis sativus*, *Cyphomandra betacea*, *Phaseolus vulgaris*. Передача за допомогою векторів невідома. Легко передається експерементально, інокуляцією соку, механічним контактом між рослинами, насінням.

Tomato mosaic virus також уражує перець, баклажани, тютюн, та багато інших рослин. Уражуючи рослини перцю, вірус викликає численні симптоми, які можна розділити на три групи: зміни форми і поверхні листкової пластинки, порушення росту і розвитку рослин. Здуття листків має вигляд опуклості на зовнішній поверхні листкових пластинок, які проявляються на початкових стадіях росту справжніх листків, вони мають множинний характер, бувають округлої, овальної та витягнутої форми. Вкорочення міжвузля, стрічковидність листка та редукція верхівки спостерігається з другої-третьої пари листків. Листок при цьому приймає округлу форму, на поверхні, поблизу верхівкової частини, спостерігаються здуття та заглиблення листкової пластинки, темно-зелена плямистість, просвітлення жилок. Іноді листок стає асиметричним, редукованим.

Слід зазначити, що при насінневих інфекціях перцю, симптоми хвороби рослин найбільш виражені на пізніх стадіях розвитку.

Pepper mild mottle virus (PMMoV)

Pepper mild mottle virus належить до роду *Tobamovirus*. PMMoV простий. Капсид спіральної симетрії довжиною 312 нм і шириною 18 нм, 4 нм в діаметрі. Крок спіралі 2,3 нм (рис. 5).

Геном не сегментований і містить лінійну одноланцюгову молекулу (+)РНК, кодує структурні і неструктурних білки, складається з 6357 нуклеотидів і містить чотири відкриті рамки зчитування, які кодують білки 126К і 183К, 28К білок і 17.5К (білок оболонки). Це перший з тобамовірусів, у якому жодна з

рамок зчитування не перекривається. Віріони у своєму складі мають один структурний білок.

Ліпіди відсутні. Реплікація вірусу відбувається у цитоплазмі.

Фізико-хімічні і фізичні властивості: ізоелектричної точка знаходиться в межах рН 3.3-3.7. Температура інактивації 95 °С. Життєздатність вірусу *in vitro* більше ніж 30 днів. Інфекційність вірусу не змінюється навіть при обробці ефіром.

Цитопаталогія: в цитоплазмі інфікованих клітин спостерігаються кристалічні включення. Вірус може бути виявлений мезофілі листка і у флоемі. В основному віріони локалізуються в цитоплазмі.

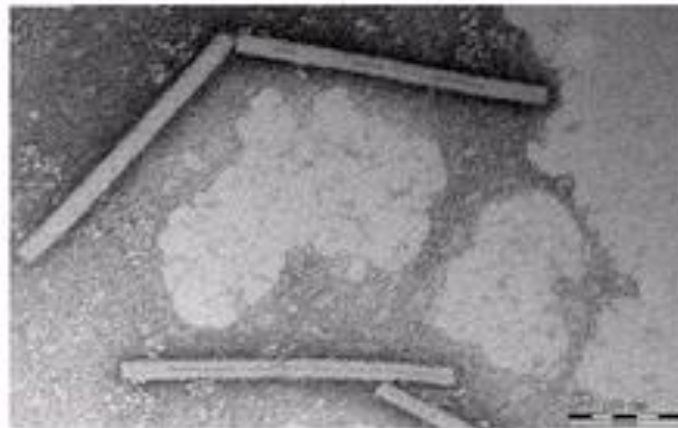


Рис. 5-Морфологія *Pepper mild mottle virus*.

РММoV уражує рослини родини лободових, губоцвітих, пасльонових. Експериментальні рослини-господарі: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum cardenasii*, *Capsicum chacoense*, *Capsicum chinense*, *Capsicum eximium*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum microcarpum*, *Capsicum praetermissum*, *Capsicum pubescens*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa*, *Datura metel*, *Datura stramonium*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana debneyi*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana sylvestris*, *Nicotiana tabacum*, *Ocimum basilicum*, *Physalis floridana*. Експериментальні нечутливі рослини: *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana rustica*, *Vigna unguiculata*.

Поява вірусу м'якої плямистості на рослинах *Capsicum* вперше стало звичним у Бразилії.

Уражуючи рослини перцю, вірус викликає численні симптоми: жовто-зелена мозаїка, затримка в рості, особливо якщо рослини інфіковані у молодому віці. Плоди дрібні, строкаті і деякі з них мають некротичні пошкодження (рис. 6, 7).



Рис. 6-Зовнішній вигляд плодів перцю овочевого уражених *Pepper mild mottle virus*.



Рис. 7-Зовнішній вигляд рослини ураженої *Pepper mild mottle virus*.

Передача вірусу за допомогою вектору не зафіксована. Саджанці можуть бути заражені механічною інокуляцією, насінням, вірус не передається пилком.

Припускають, що людина може діяти в якості транспортного засобу для поширення *Pepper mild mottle virus* завдяки тому, що вірус зберігає свою інфекційність навіть після перебування у шлунково-кишковому тракті.

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMM)

CGMM належить до роду *Tobamovirus*. Вірус простий, без зовнішньої оболонки. Нуклеокапсид спірального типу розміром 280x15нм. Наявний осьовий канал радіусом 20А. Віріон містить одну молекулу однопітчастої +РНК. Послідовність полі А-відсутня 3'-кінець має тРНК подібну структуру. Геном здатний приєднувати гістидин. Процентне співвідношення РНК та білка становить 5:95. Геном віруса CGMM кодує 4 білки: хеліказа-метилтрансфераза, РНК-залежна РНК-полімераза, білок руху (транспортний), білок оболонки (капсидний).

Найближча до 5'-кінця рамка зчитування ORF1 кодує білок молекулярною масою (Mr) 126кДа з хеліказною та метилтрансферазною активностями, а отже приймає участь у формуванні кап-структури.

РНК-залежна-РНК-полімераза Mr 183кДа має спільний з попереднім білком кодон-ініціатор транскрипції (AUG), але утворюється за рахунок скрізного читання через слабкий кодон-термінатор (UAG) з ORF1 та ORF2. Це можливо у тому випадку, коли відповідна клітинна супресорна аміноацил-тРНК впізнає кодон-термінатор (нонсенс-кодон) наприкінці даного цистрону (UAG). Таким чином, замість сигналу термінації в продовжуваний поліпептидний ланцюг вбудовується тирозин і ланцюг і надалі елонгується. Для скрізного читання важлива не лише наявність відповідних супресорних молекул тРНК, але й оточення кодону-термінатору, особливо два наступні за ним кодони (так зване цис-оточення нонсенс кодону). Необхідно відмітити, що при скрізному читанні початковий білок, розташований ближче до точки початку трансляції, завжди синтезується в більшій кількості ніж продукт скрізного читання. Їх співвідношення в інфікованій клітині складає 30:1. При цьому вважається, що перший білок, який зчитується з ORF1, фактично є енхансером транскрипції та

реплікації і підвищує її швидкість в 10 разів. Важливо, що обидва білки (126 і 183кДа) транслюються безпосередньо з геномної РНК.

Білок руху Mr 30кДа зчитується з ORF3. Зв'язуючись з клітинними плазмодесмами, він сприяє збільшенню їх діаметра. Також цей білок діє як молекулярний шаперон, зв'язуючись з вірусною РНК. CGMM здатний поширюватись на досить великі відстані по рослині у комплексах, що називаються вірусспецифічними рибонуклеопротеїнами і містять вірусну РНК, капсидний та транспортний білки. Білок руху зв'язує нуклеїнову кислоту віруса, що сприяє як її міжклітинному транспорту (на короткі дистанції), так і транспорту провідними тканинами (на великі відстані). Можливо, що на стадії, яка передує транспорту вірусної РНК, відбувається одягання її молекулами транспортного білку, що переключає вірусну РНК з реплікації та трансляції на транспортну функцію. Роздягання такого комплексу відбувається, можливо, при проходженні РНК крізь плазмодесму.

Білок руху має високу спорідненість до ЕПР, мікротрубочок і мікрофіламентів. Після реплікації РНК та утворення її комплексу з транспортним білком цей комплекс може рухатись вздовж мікротрубочок та мікрофіламентів до плазмодесм, розміри пор яких він же і збільшує. Цілком можливо, що такі комплекси рухаються, не втрачаючи контакту з ЕПР. Присутність капсидного білка у цих комплексах для транспорту CGMM на короткі дистанції не потрібна.

Білок оболонки кодується 3'-кінцевою ORF4. Mr становить 17,2кДа. Характерною його особливістю є здатність самоансамблюватися у капсид при певних значеннях іонної сили та при наявності РНК. Збірка здійснюється за законом мінімуму вільної енергії без матриці і зовнішньої енергії. У випадку збірки часток для утворення комплексу РНК-білок на послідовності РНК існує ділянка ініціації збірки. Вона може взаємодіяти з олігомерними агрегатами капсидного білка з утворенням нуклеаційного комплексу. Збірка відбувається в обидва боки РНК, але у напрямку 3'-кінця- ефективніше. Точка початку збірки віріона розташовується всередині 3'-кінцевої ORF капсидного білку. Слід також

зауважити, що два останні білки 30 та 17.2кДа, транслюються, на відміну від білків реплікації, не з геномних, а з відповідних субгеномних мРНК.

Цитопатологія. При обстеженні рослини огірка, ураженого CGMM, віріони було знайдено у листках, мезофілі, епідермісі, васкулярній паренхімі, ксилемі, флоемі, клітинах-супутниках, цитоплазмі і клітинних вакуолях. В інфікованих клітинах часто можна спостерігати включення, які являють собою гексагональні кристали, розміщені в цитоплазмі. Включення містять віріони. Вірусних часточок не було знайдено в ядрі і хлоропластах. Зміна клітинних органел, викликана CGMM, була наявною у чітко збільшених і вироджених мітохондріях, які вміщували маленькі везикули розміром 50-70 нм в діаметрі, пов'язані одиночною мембраною. Більшість везикул були зосереджені у просторі між зовнішньою і внутрішньою мембранами мітохондрій.

Шляхи передачі. Першоджерелом інфекції є насінневий матеріал. Вірус міститься на верхній частині плівки насіння. Передача віруса потомству відбувається внаслідок травмування тканини паростків, куди й потрапляє інфекція. Особливо високий процент поширення віруса насінням спостерігається при сівбі свіжозбираним насінням. Передача CGMM через ґрунт відбувається з ґрунтовим розчином. Небезпечним для огірків є не рослинні рештки, а вільний вірус, який переходить у ґрунтовий розчин при розкладанні їх. CGMM передається також механічним шляхом, через контакт листків. Біологічного вектора для цього віруса не знайдено.

Було показано передачу CGMM за допомогою повитиці (*Cuscuta*). Так, типовий штам CGMM передається: *C.subinislusa*, *C.lupulliformis*, *C.campestris*, а аукуба мозаїки ВО-4 за допомогою *C.campestris*.

На сьогоднішній день відомі такі штами CGMM: типовий CGMM (ВО-3); аукуба мозаїки (ВО-4); кавуновий штам (CGMM-K); кавуновий штам SH (CGMM-SH); штам, виділений з сітчастої дині (CGMM-IS); корейський кавуновий штам (CGMM-KW); корейський штам (CGMM-NS); корейський штам (CGMM - КОН); огірковий штам (CGMM-O); огірковий штам Йодо (CGMM -Y). Штами CGMM-типовий і ВО-4 вперше були ізольовані з рослин огірків і описані у

Великобританії, тоді як CGMM-K ізольований з кавунів, CGMM-O та CGMM-Y ізольовані з огірків і походять з Японії. CGMM-I був ізольований з сітчатої дині в Індії.

МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСІВ РОСЛИН

Найчастіше у вірусологічних дослідженнях використовують методи молекулярної біології, за допомогою яких можна визначити структуру вірусних часток, способи проникнення їх у клітину й особливості репродукції вірусів, первинної структури вірусних нуклеїнових кислот і білків. Вірусологічні методи досліджень ґрунтуються також на імунологічних процесах (взаємодія антигена з антитілом), біологічних властивостях вірусів (здатні до гемаглютинації, гемолізу, ферментативна активність), особливостях взаємодії вірус з клітиною-хазяїном (характер цитопатичного ефекту, утворення внутрішньоклітинних включень).

На сьогодні існує широкий діапазон методів виявлення та візуалізації реакції між антигеном та антитілом. Для виявлення та ідентифікації вірусів, які містяться в клітинах чи тканинах, широко використовується метод імунофлуоресценції (прямої та непрямої) за участю флюорохрому, наприклад, флюоресцеїну, ковалентно приєднаного до очищених противірусних антитіл. Метод імуноферментного аналізу поділяється на дві великі групи: твердофазний і гомогенний аналіз. У твердофазному методі використовується принцип імобілізації одного із компонентів (антигену або антитіла) на носій. Гомогенні методи аналізу були розроблені для визначення низькомолекулярних сполук – гаптенів, гормонів, фізіологічно активних сполук. ІФА дуже зручний, оскільки антигеном у фітовірусології в імуносорбентному тесті може бути свіжий сік рослин, очищені вірусів препарати, гомогенат із насіння або з комах-переносників.

Відбір зразків та підготовка для аналізу

Для досліджень були відібрані зразки рослин огірків, кабачків, перцю овочевого, томатів. Рослинні зразки відбирали шляхом візуального обстеження

рослин на наявність вірусних симптомів. Для досліджень використовували листки середнього або верхнього ярусу та плоди рослин. Відібрані рослини мали видимі симптоми – мозаїку, некрози, хлорози, деформацію листової пластини та деформацію плодів (рис. 8).



(А) *Cucumber green mottle mosaic tobamovirus*



(Б) *Tobacco mosaic virus*



(В) *Tomato mosaic virus*



(Г) *Pepper mild mottle virus*

- (А) – темно-зелені пухирчасті здуття шкірки плоду огірку;
- (Б) – нитчастість листової пластинки на рослинах кабачку;
- (В) – жовто-зелена мозаїка, деформація листової пластинки томату;
- (Г) – жовто-зелена мозаїка листової пластинки перцю звичайного.

Рис. 8-Симптоми вірусної етіології на рослинах томату, перцю звичайного, огірках і кабачках.

Після відбору зразки рослин гомогенізують в 0,1 М PBS у співвідношенні 1:2 з подальшим центрифугуванням у режимі 5 тис. об/хв. протягом 15 хв при 4°C. Відбирають надосад, який вподальшому використовується для імуноферментного аналізу.

Культивування вірусів рослин. Для культивування фітопатогенних вірусів застосовуються сприйнятливі до них рослини, які вирощуються у природних умовах або в теплицях і оранжереях.

Рослина, у якій культивуються вірус, повинна бути:

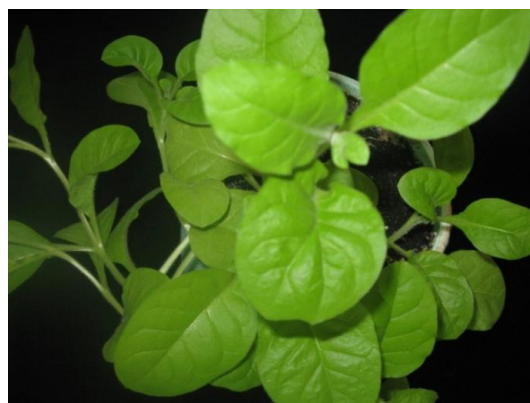
- 1) придатною для нагромадження вірусу у великій кількості;
- 2) стійкою проти зараження іншими близькими вірусами;
- 3) не містити речовин, які здатні інактивувати або осаджувати вірус в екстракті;
- 4) стійкою до інсектофунгіцидів;
- 5) стійкою до бактерійних та грибкових захворювань.

Для культивування фітопатогенних вірусів найчастіше використовують молоді рослини, які добре ростуть, не мають будь-яких патологічних ознак і не містять у клітинах високих концентрацій фенолів, слизу, рибонуклеази тощо, а також можуть інгібувати або незворотно осаджувати віруси. Такими рослинами, наприклад, є тютюн сорту Самсунг для культивування вірусу тютюнової мозаїки, дурман для вирощування X-вірусу картоплі. Нині описано велику кількість рослин-індикаторів різних родів і родин, які застосовують для культивування вірусів.

Рослини-індикатори, умови, за яких їх вирощують, і час, коли рослини можна використовувати для виділення вірусів, треба вибирати так, щоб вихідна концентрація вірусних часток була якомога вищою. За даними Р.Метьюза, концентрація багатьох вірусів досягає максимуму через кілька днів або тижнів, а потім дуже швидко знижується (рис. 9).



А



Б

А – некрози на рослин *Nicotiana tabacum* при обробці ізолятом (TMV)

Б – контрольна рослина *Nicotiana tabacum*.

Рис. 9-Симптоми вірусної етіології на рослинах-індикаторах *Nicotiana tabacum*

Матеріальне забезпечення: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* у стадії 3-4 справжніх листків, вірус - *Tobacco mosaic virus*, абразив – карборунд (скляний пісок), скляні палички, 300 мл дистильованої води, фосфатний буферний розчин рН 7,4, стакани з дизрозчином, етикетки та макрери, 1% водним розчином KMnO_4 .

Проводиться підбір рослин-індикаторів для дослідів. Насіння рослин попередньо обробляли 1% водним розчином KMnO_4 впродовж 15 хв. Після цього насіння обробляли дистильованою H_2O та пророщували у чашці Петрі. Молоді рослини пересаджували в ґрунт та після появи 1 – 2 справжніх листків. Як вірусний матеріал були взяті зразки, що давали позитивний результат в ІФА. Інфікування проводим у листову пластинку за допомогою карборунда наступним чином:

1. Дослідні та контрольні рослини маркували із зазначенням вірусу, яким проводиться інокуляція, способу механічного ураження та дати ураження. При механічному ураженні рослин методом втирання у листову пластинку її умовно ділили на дві половини, одна з яких була контрольною, інша - дослідною.

2. Посипали листову пластинку карборундом, втирали скляною паличкою в контрольну половинку буферний розчин, у дослідну – вірусний препарат.

3. Після 10 хвилин інкубації карборунд та надлишок вірусного матеріалу змивали дистильованою водою у стакани з дезрозчином.

4. Переносили рослини у теплицю без світла на одну добу, а потім спостерігали за рослинами при стандартному освітленні.

5. Через два тижні проводили облік результатів та зробили висновки.

Імуноферментний аналіз

На початку 1970-х років був запропонований метод, який поєднує ферментативний та імунохімічний підходи, що призвело до створення імуноферментного аналізу (ІФА), в якому антитіло виступає як специфічний детектор речовини, що визначається, а фермент – як маркер імунохімічної реакції, з допомогою якого візуалізується утворення комплексів.

Імуноферментний аналіз (ІФА) – це метод, який поєднує в собі високу специфічність імунологічних реакцій з чутливою каталітичною дією ферментів

При постановці ІФА були використані комерційні тест-системи виробництва Loewe (Німеччина). Постановка аналізу проводилася відповідно до рекомендацій виробника тест-систем. При проведенні аналізу були використані стандартні (позитивні та негативні) комерційні контролі. Для статистичної достовірності кожен із дослідних зразків при постановці ІФА аналізувався у трикратній повторності. Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Termo LabSystems Opsis MR (США) при довжині хвилі 405 нм (для АТ, мічених лужною фосфатазою). За позитивний результат приймався показник E_{405} , що втричі перевищував показник негативного контролю.

Постановка прямого імуноферментного аналізу

Матеріальне забезпечення: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* (К-), рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ (К+), антитіла ВТМ мічені ферментом лужною фосфатазою, фосфатний буферний розчин (PBS) рН

7,4 Tween-20, субстрат, субстратний буфер рН9,8, 2М NaOH, 96-лункові полістеролові плашки, маркери.

При прямому варіанті ІФА лунки плашки покривають тестуючим антигеном, інкубують, потім надлишок антигену видаляють і додають вірус специфічне антитіло, кон'юговане з ферментом. Після інкубації надлишок кон'югату видаляють і додають субстрат (хромоген). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену. Метод потребує мінімальної кількості операцій, незначної витрати реагентів і легко може бути автоматизований.

Хід роботи

1. Плашки промиваємо дистильованою водою
2. В лунки вносимо АГ у карбонатному буфер рН 9,6 (100 мкл зразку + 100 мкл буферу)
3. Інкубуємо 1 год при температурі + 37 °С
4. Проводимо відмивку буферном (PBS) рН 7,4 + Tween-20, 3 рази по 3 хв.
5. Наносимо АГ* мічені лужною фосфатазою по 200 мкл у кожен лунку
6. Інкубуємо 1 год при температурі + 37 °С
7. Проводимо відмивку буферном (PBS) рН 7,4 + Tween-20, 3 рази по 3 хв.
8. Наносимо субстрат у субстратний буфер рН 9,8 (1мкг/1 мл) у кожен лунку по 200 мкл.
9. Інкубуємо 1 год при температурі + 37 °С
10. Фіксуємо результати за допомогою рідера, при довжині хвилі 405 нм.

Метод непрямого імуноферментного аналізу

При постановки непрямого ІФА ферментну мітку вносять в антитіла. Формуючи комплекс Аг-Ат, іммобілізований на твердому носії інкубують з антивидовими антитілами, які мають ферментну мітку Ат2-Ф. Перевагою цієї модифікації є простота підготовки реагентів. Дана модифікація дозволяє використовувати неочищений вірусний препарат.

Матеріальне забезпечення: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* (К-), рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ (К+), специфічні

сироватки до ВТМ, антитіла мічені ферментом лужна фосфатаза, обезжирене сухе молоко, карбонатний буфер, рН 9,6, фосфатний буферний розчин (PBS) рН 7,4, Tween-20, субстрат, субстратний буфер рН 9,8, 2М NaOH, 96-лункові полістеролові плашки, маркери.

Схема проведення непрямого ІФА:

1. Наносили АГ в карбонатному буфері, рН 9,6 в концентрований вірусний препарат, здоровий сік огірка в розведенні 1:50 в якості негативного контролю та інкубуємо протягом ночі при +4°C.

2. Відмиваємо 3 рази по 5 хв відмивочним буфером (0,1М PBS+ Tween-20, рН 7,4).

3. Проводимо блокування 1% знежиреним сухим молоком на 0,1М PBS, рН 7,4 та інкубуємо протягом 2 год при температурі 37°C.

4. Відмиваємо 3 рази по 5 хв відмивочним буфером (0,1М PBS+ Tween-20, рН 7,4).

5. Наносимо АТ1 на буфері для розведення АТ, рН 7,4 (1% сухе молоко+0,1М PBS+0,05% Tween-20, рН 7,4) В кожну лунку по 100 мкл. Інкубуємо 2 год при температурі 37°C.

6. Відмиваємо 3 рази по 5 хв відмивочним буфером (0,1М PBS+ tween-20).

7. Наносимо АТ2 на буфері для розведення АТ. В якості антивидових АТ використовували антикролячі АТ, конюговані лужною фосфатазою ("Dianova", Німеччина). Інкубуємо 2 год при температурі 37°C.

8. Відмиваємо 3 рази по 5 хв відмивочним буфером (0,1М PBS+ Tween-20) і 1 раз 0,1М PBS.

9. На останньому етапі вносили субстратний буфер для лужної фосфатази з хромогеном (97 мл діетаноламіну довести до 1 л H₂O, HCl до рН 9,8.). В якості субстрата використовували N-п-нітрофенілфосфат, С=1мг/мл. Реакцію зупиняли 3М NaOH.

Імуноферментний аналіз в модифікації «сендвіч»

ІФА у модифікації «сендвіч» – метод розповсюджена завдяки простоті, високій специфічності й чутливості. Відповідно до схеми даного варіанта твердофазного ІФА, антитіла, які абсорбують на твердій фазі, інкубували з досліджуваним зразком, який містить антигени. Після відмивання в лунки вносили мічені ферментом антитіла до того ж антигена та відмивали від кон'югатів фермент-антитіло, які не зв'язалися з іммобілізованим антигеном. Потім додавали субстрат і фіксували розвиток кольорової реакції. Останнім часом ця модифікація знаходить все більше широке використання, так як для постановки реакції немає необхідності отримувати специфічні для кожного конкретного випадку ензим-мічені антитіла.

Матеріальне забезпечення: здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* (К-), рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ (К+), специфічні сироватки до ВТМ, антитіла мічені ферментом лужна фосфатаза, фосфатний буферний розчин (PBS) рН 7,4, Tween-20, субстрат, субстрат ний буфер рН 9,8, 2М NaOH, 96-лункові полістеролові плашки, маркери.

Схема проведення сендвіч-ІФА:

1. Наносимо у плашки для ІФА антитіла 1 (АТ₁) на карбонатному буфері (рН 9,6). Інкубуємо протягом 4 год. при +37° С світлу годину доби або у темну год. доби 4° С.

2. Відмиваємо - 3 рази по 5 хв (0,1 М PBS +0,2% Tween – 20).

3. Наносимо антиген (АГ) - сік досліджуваного матеріалу у співвідношенні 1:2 в 0,1 М фосфатному буфері, що містив 0,1% сухе молоко та 0,05% Tween-20. Інкубуємо протягом 4 год. при +37° С світлу годину доби або у темну год. доби 4° С.

4. Відмиваємо - 3 рази по 5 хв (0, 1 М PBS + Tween – 20).

5. Наносимо АТ₂, мічені лужною фосфатазою специфічні до АГ. Інкубуємо протягом 4 год. при +37° С світлу годину доби або у темну год. доби 4° С.

6. Відмиваємо - 3 рази по 5 хв (0, 1 М PBS + Tween-20); 1 раз 5 хв (0,1 М PBS).

7. Наносимо субстратний буфер для лужної фосфатази з хромогеном (97 мл діетаноламін довести до 1 л H₂O, HCl до рН 9,8.). В якості субстрату використовували N-n-нітрофенілфосфат, С=1мг/мл. Для зупинки реакції вносили стоп – реагент (3 М NaOH).

8. Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Termo Labsystems Opsismk (США) при довжині хвилі 405 нм.

Статистична обробка результатів

Для статистичної оцінки отриманих результатів використовували статистичний аналіз та t-критерій Стюдента. Також було використовують можливості програмного забезпечення Microsoft Excel.

Статистична обробка результатів проводилася з вирахуванням стандартного відхилення.

$$E = \bar{E} \pm a\sigma$$

$$\bar{E} = (E_1 + E_2 + \dots + E_i) / i$$

$$A = |E_{\max} - \bar{E}| = |E_{\min} - \bar{E}|,$$

де \bar{E} – достовірне значення екстинкції; E – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції $E_1 \dots E_i$; σ – стандартне відхилення.

Методика оцінки ступеню патогенності ізолятів ВТМ у різних сортах сільськогосподарських культур

Здатність збудника хвороби викликати зараження та ураження рослин тісно пов'язана з такими його властивостями, як патогенність, вірулентність. Патогенність – це здатність збудника викликати захворювання (ураження) тої чи іншої рослини (виду рослин) і завдавати їй певної шкоди. Чим шкідливіша хвороба, тим більш патогеннішим вважається збудник. Біологічні агенти, яким властива патогенність, називають патогенами.

Для експерименту брали відомий штам вірусу, щоб порівнювати із досліджуваними зразками, щоб перевірити патогенність потрібно уразити досліджуваними ізолятами рослини-індикатори. Рослини-індикатори – це рослини, які дають чітку специфічну реакцію на даний вірус, що легко відрізняється від реакції цієї рослини на інший вірус. Інфікування проводили вірусомісними матеріалом після появи на рослинах 2 – 3 справжніх листків за допомогою карборунда. Спостерігаємо симптоми, порівнюємо морфологію утворення некрозів на рослинах-індикаторах тощо.

Виділяємо ізоляти із рослин-індикаторів і уражуємо відповідні види рослин із яких їх виділили, кожного виду по три сорти. Інфікування проводили вірусомісними матеріалом після появи на рослинах 2 – 3 справжніх листків за допомогою карборунда. Через два тижні проводили облік результатів. Проводимо дослідження біологічних особливостей.

Готуємо препарати для світлової мікроскопії для дослідження внутрішньоклітинних змін, які відбуваються під дією вірусної інфекції. Проводимо опис якісних та кількісних змін мікроскопічних структур.

Профілактика та оздоровлення сільськогосподарських культур методом мікрогравітації.

Створення орбітальних космічних станцій дало поштовх становленню нової галузі біологічних наук – космічної біології, одним із важливих напрямків якої є вивчення впливу специфічних умов гравітації (трансформованого середовища) на життєдіяльність рослин і, зокрема, на їх взаємовідносини з вірусами та мікроорганізмами.

На Землі для моделювання біологічних ефектів мікрогравітації в космічному польоті застосовуються різні пристрої, коло яких значно розширилося за останні роки. Так одним із них є вдосконалена модель кліностата «Еколог», що була сконструйована і модифікована в Інституті агроєкології і природокористування НААН, який реалізує декілька варіантів

переорієнтації поздовжньої осі рослин відносно вектора прискорення сили земного тяжіння.

Відомо, що мікрогравітація впливає на репродукцію вірусу в клітинах, тому як один із засобів боротьби з вірусними захворюваннями було задіяно мікрогравітацію для оздоровлення рослин, що були уражені вірусом ВТМ.

В роботі було задіяно горизонтальні та вертикальні оберти контейнерів з об'єктами в основному на частоті обертання 1,8 – 2,0 об/ хв при оточуючій температурі +19 – +23°C, освітленості – 8-10 тис. лк. (Рис. 10).



Рис. 10-Вплив мікрогравітації на уражені рослини

Для ідентифікації вірусних антигенів надалі ми проводили перевірку рослин *N. tabacum* сорту Гавана імуноферментним аналізом, що побачити чи призвела мікрогравітація до знизився вміст вірусних антигенів.

Матеріальне забезпечення: рослини тютюну сорту *Nicotiana tabacum*, які були уражені вірусом тютюнової мозаїки, кліноSTAT Еколог.

Хід роботи

1. Помістити досліджувані рослини у контейнери установки «Еколог»
2. У роботі задіяти горизонтальні оберти контейнерів при частоті обертання 1,8–2,0 об/хв і температурі середовища +19–23 °С, освітлені 8 –10 тис. лк;
3. КліноSTATування проводити протягом 36 днів по 4 год.

4. Динаміку ВТМ контролюва імуноферментним аналізом, електороною мікроскопією та рослинами-індикаторами.

Ключ-схема оцінки шкодочинності ВТМ на різних сільськогосподарських культурах.

Критерії для створення ключ-схеми оцінки шкодочинності ВТМ для сільськогосподарських культур. Враховуючи значне поширення ВТМ в різних кліматичних регіонах слід відмітити, що більшість ізолятів цього вірусу зберігають подібні антигенні детермінанти між собою до 32,5% у зв'язку з високою мінливістю цього вірусу. Досліджуваний патоген слід розглядати на основі універсальних та індивідуальних методів. Розроблено ключ-схему оцінки шкодочинності вірусу тютюнової мозаїки за такими критеріями:

- загальний габітус рослини;
- специфічні рослини-індикатори (як наприклад *Datura stramonium L.*, *Datura metel*, *Chenopodium album*);
- імунологічний тест (непрямий і прямий імуноферментний аналіз, ухтирлоні тест);
- капсидний білок вірусу;
- люмісцентна мікроскопія;
- сиквенування нуклеотидних послідовностей геному ВТМ;
- математичне моделювання.

Використання люмінесцентної мікроскопії для вивчення включень які вірус формує у рослині (відмічається що ВТМ-дикого штаму) формує у рослині кристалічні включення ромбовидної форми. Штам ВТМ із багаторічних рослин формує у рослині довгасті включення, які добре проглядаються у волосках томатів при дослідженні їх під світловим мікроскопом. Комплексні дослідження закономірностей розвитку ізолятів ВТМ за допомогою математичних моделей.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Osman T. A. M. Complete replication in vitro of TMV RNA by a template-dependent, membrane-bound RNA polymerase / T. A. M. Osman, K.W. Buck // *Journal of Virology*. – 1996. – V. 70, № 9. – P. 6227-6234.
2. Nucleotide Sequences of Two Korean Isolates of Cucumber Green Mottle Mosaic Virus / Sang-Min Kim, Jung-Myung Lee, Kyu-Ock Yim [et al.] // *Molecules and Cells*. – 2003. – V. 16, № 3. – P. 407-412.
3. Detection of Four Apple Viruses by ELISA and RT-PCR Assays in Turkey / K. Caglayan, Serce C. Ulubas, M. Gazel [et al.] // *Turk J. Agric. For.* – 2006. – № 30. – P. 241-246.
4. Virus taxonomy. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / [eds. Andrew King. et al.]. – Wien: Springer-Verlag, 2012. – 1327 p.
5. Поліщук В. П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія» / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, Т. П. Шевченко. – Київ : Фітосоціоцентр, 2005. – С. 129-133.
6. Мэтьюз Р. Вирусы растений / Р. Мэтьюз ; [под ред. И. Г. Атабекова]. – М. : Мир, 1973. – С. 33-51, 442-469.
7. Віруси рослин родини *Cucurbitaceae*, що циркулюють в агроценозах України: розробка діагностикумів на основі імуноферментного аналізу та їх застосування : методичні рекомендації / [Руднева Т.О., Шевченко Т.П., Бисов А.С. та ін.]. – Київ, 2010. –11 с.
8. Influence of modeled microgravity on tobacco mosaic virus / N.P. Sus, A.V. Orlovskaya, O.A. Boyko, V.O. Tsvigun, A.L. Boyko // *Ecology and noospherology*. – 2018. – 29 (2). P 138-140.
9. Пожилов І., Руднева Т., Шевченко Т., Шевченко О., Цвігун В. Філогенетичний аналіз гена капсидного білка ізолятів вірусу мозаїки томатів, що циркулюють в Україні. Вісник Київського Університету імені Тараса Шевченка. Сер: Біологія. 2019.1 (77): 71-79.

ДОДАТОК СКЛАД БУФЕРІВ

Карбонатний буфер рН 9,6 на 20 мл.

Na₂CO₃ – 0,032 мкг

NaHCO₂ – 0,056 мкг

води 20 мл

Буфер для нанесення АТ на 20 мл (непрямий ІФА)

200 мкл — сухого молока

5 мл — відмивки

15 мл — (PBS) рН 7,4

Блокуючий буфер (для непрямого ІФА)

1 мкг сухого молока

1мл PBS

Буфер для нанесення АТ на 20 мл («сандвіч» ІФА)

200 мг – PVP

0,020 мг – сухого молока

10 мл – PBS

1краплина – Tween-20

Фосфатний буферний розчин (PBS) рН 7,4

NaCl – 8,0 г

KH₂PO₄ – 0,2 г

Na₂HPO₄ *12 H₂O – 2,8 г

KCl – 0,2 г

Об'єм розчину доводимо до 1 л дистильованою водою

Стон розчин 3М NaOH

NaOH – 120г

H₂O – 1 л

Буфер відмивки

1М PBS

0,2% Tween-20