

Винахід відноситься до біології і сільського господарства.

Ефективні способи зберігання вірусів рослин необхідні на всіх етапах вивчення виділених в природних умовах патогенів і практичного їх використання для подальшої розробки і виробництва діагностиків, при організації інфекційних фонів для контролю вірусостійкості селекційного матеріалу, напрацювання вакцинних препаратів, тощо. Методи мають бути придатними для підтримання віруса, гарантувати тривале зберігання його характеристик, бути зручними для використання в практичній роботі.

Проблема підтримання в активному стані колекції фітопатогенних вірусів в основному вирішується насунанням патогенів в вегетуючих рослинах, що є дорогим, трудомістким, потребує постійного ретельного фітосанітарного контролю і все ж не гарантує від випадкового перезараження зразків.

При роботі з вірусами картоплі їх часто зберігають в бульбах ураженої рослини, що потребує виключно ізоляованих умов вирощування зразків при постійному контролі зараженості. При цьому не завжди вдається уникнути перезараження іншими патогенами. Крім того, при ураженні патогенними штамми рослини картоплі взагалі не дають бульб 3-4 репродукції.

Визначений час можливо зберігати інфекційний матеріал в замороженому листі, ліофілізованому соку інфікованих рослин, у вигляді чистих препаратів. В той же час, відмічені зміни властивостей і при зберіганні очищених препаратів вірусів (Lane L. Propagation and purification of RNA plant viruses // Meth. Enzymol. Odando e.a. - 1986. - v.118. - 687-696).

Все більш широке застосування знаходять методи культури клітин і тканин (Жук И.П. Культура клеток и тканей растений в молекулярнобиологических и прикладных исследованиях фитопатогенных вирусов (обзор) // С.-х. биология. - 1987. - №8. - 57-62; Жук И.П., Л.Ф. Диденко. Использование культуры клеток и тканей при изучении вирусов растений // Вирусные болезни с.-х. культур. - М., Колос. - 1980. - 46-122; Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимоотношений патогена и растения-хозяина // Биол. науки. - 1990. - №2. - с.6-21).

Найбільш близьким за ознаками до пропонованого процесу довгострокового культивування фітопатогенних вірусів в рослинах культури in vitro є спосіб підтримання колекції вірусів в лабораторних умовах в калусній культурі рослин (Тимошенко Н.А., В.А. Внучкова, В.К. Винниченко, С.К. Завриев Поддержание У-вируса картофеля в культуре калусной ткани *Nicotiana glutinosa* // Докл. ВАСХНИЛ. - 1989. - №11. - с.8-11; Dedic P. Konzervace a uchovani infekcnosti A,Y a M viru bramboru // Ved. Prace Vyzk. Slecht. Ustavu Brambor v Havickove Brde. - 1983. - 9. - 63-70). На основі антигенів, розмнжених в калусній культурі, отримані діагностичні антисироватки (Горбунова Н.И., Л.Б. Шевцова, А.Б. Соболева, Р.В. Лялько. Приготовление диагностических антисывороток на основе вирусных антигенов, размноженных в культуре растительной ткани. // Метод, указания. - М., 1986).

Недоліком цього способу є те, що довгострокове субкультивування вірус-інфікованої калусної тканини веде до створення нових форм вірусу з ослабленою вірулентністю (Жук И.П., А.Д. Бобырь, Т.Н. Сахно. Ослабление вирулентности вируса мозаики свеклы в культуре ткани сахарной свеклы // Докл. ВАСХНИЛ. - 1990. - №12. - с.15-17). Крім того, необхідним є додавання в поживне середовище речовин-активаторів репродукції вірусів (аденін, гліцин, валін тощо).

Мета винаходу, що пропонується, - розробка способу ефективного лабораторного довгострокового культивування фітопатогенних вірусів в рослинах культури in vitro.

Для цього:

здорові рослини картоплі або рослини-індикатори інокулювали штамми фітопатогенних вірусів;

за результатами вірусологічного аналізу відбирали інфіковані рослини;

із фрагментів стебел уражених рослин після попередньої стерилізації діацидом в умовах боксу виділяли бокові бруньки на поживне середовище Мурасиге-Скута (Muraschige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantamm. - 1961. - v. 15, n. 3. - 473-497) в пробірці;

отримували рослини-регенеранти.

Вірус-інфіковані рослини-регенеранти підтримували в культурі in vitro шляхом мікроживцювання за числом міжвузлів в стерильних умовах (Винклер Г.Н., Бутенко Р.Г. Применение черенкования при выращивании безвирусных растений картофеля методом культуры меристемы // Физиология растений. - 1970. - 17, №4. - 851-853; Остапенко Д.П. Метод культуры меристемы в элитном семеноводстве картофеля на безвирусной основе в УССР // Автореф. дисс. на соиск. уч. степ. канд. с.-х. наук. - 1978). Культивування проводили в умовах люміноста.

Ефективність застосування процесу довгострокового культивування фітопатогенних вірусів в рослинах культури in vitro, що пропонується, відображають наведені приклади.

Приклад 1.

Аналіз вірусінфікованого матеріалу, отриманого в культурі in vitro.

Для контролю використовували симптоматичний, серологічний, імуноферментний, електронномікроскопічний, індикаторний методи діагностики

Інфіковані вірусами рослини картоплі та тест-рослини безпосередньо в пробірці були життєздатними, зовні не відрізнялися від здорових рослин того ж виду, або проявляли на листі слабку мозаїку (в залежності від комбінації рослина-вірус) при дотриманні в люміностаті оптимального температурного та світлового режиму. Аналіз пробіркових рослин-носіїв вірусів крапельним та імуноферментним методами виявив відповідні віруси.

При висаджуванні в ґрунт пробіркових рослин-носіїв вірусів, а також мікробульб від уражених вірусами пробіркових рослин картоплі, спостерігали проявлення симптомів, характерних для означеного зразка. В табл.1 наведені результати аналізу висаджених в ґрунт пробіркових рослин картоплі, інфікованих штамми М-вірусу картоплі (МВК) і S-вірусу картоплі (SBK) різної патогенності: симптоматичні характеристики на рослині-хазяїні і на рослині-індикаторі (*Lycopersicon chilense* Dun., диференціатор штамів карпавірусів картоплі) відповідали вихідним характеристикам.

Симптоматичне проявлення штамів MBK і SBK на висаджених в ґрунт пробіркових рослинах картоплі

Зразок вихідна характеристика	Симптоми на рослинах:		Виявлені віруси
	картоплі	L. chilense	
Слабопатогенний штам MBK M 139	LCuSI	бс	MBK
картопля с. Луговська	LCuSI, бс	бс	MBK
с. Невська	LcuSI	бс, VC SI	MBK
с. Приєкульська рання			
Сильнопатогенні штами MBK			
картопля с. Приєкульська рання, M200	LCu, Dis, St	LDis, St	MBK
с. Луговська, M200	LCu, St	LDis, St	MBK
с. Світанок київський M <sub>СК</sub>	LTw, St	LDis, M, St	MBK
с. Пекуровська M <sub>Пек</sub>	LTw, St	LDis, M, St	MBK
Середньопатогенний штам SBK 4	LEp S1	LEp	SBK
с. Воротинська рання			

Умовні позначення: бс - рослини безсимптомні; LCu - закручування листя верхівки; LDis - деформація листків; LTW - кучерявість; LEp - скривлення листків вздовж головної жилки; M - мозаїка; VC - просвітління жилок листків; SI - слабо виражений симптом; St - відставання в рості рослин.

Приклад 2.

Відповідність властивостей штамів вірусів, що інфікують рослини пробіркової культури, вихідним характеристикам через 5 років підтримання в культурі *in vitro*.

Для проведення контролю висадили в ґрунт мікробульби і пробіркові рослини картоплі - носії вірусів, провели вірусологічний аналіз зразків. Встановили відповідність властивостей штамів вірусів, присутніх в пробіркових рослинах-носіях, їх паспортним характеристикам за такими показниками: проявлення симптомів на рослинах картоплі і рослинах-індикаторах, значення точки температурної інактивації і кінцевого розведення соку без втрати інфекційності, рівень активності РНКаз в соку листя рослин (табл. 2, 3).

Таблиця 2

Характеристики штамів MBK різної патогенності при 5-річному зберіганні в рослинах картоплі в культурі *in vitro*

Характеристики	Показники для штамів M M139 слабопатогенный	BKM 200 сильнопатогенный
ТТt °C	70-73	70-73
ТКР	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup> -10 <sup>-3</sup>
Строк вистоявання при 18-24°C, дн.	2-3	2-3
Реакція рослин картоплі: симптоми	бс, LCu SI	LTW, St
урожай, ± до контролю, %, (с. Приєкульська рання, 3 бульбова репродукція)	+ 16,6-36,6	-24,3-76,6
Реакція тест-рослин:		
марь біла	L:YSp	L:YSp
марь стінна	L:YSp	L:YSp
марь кіноа	L:YSp	L:YSp
вігна початкова	L:Ne	L:Ne
дурман індійський	S:LCu	S:LCu
тютюн Дебнея	L:YSp	L:YSp
паслін полягаючий	S:VCSI	S:LCu, St
томат чилійський	бс, S:LCuSI	S:LCu, M
РНКазна активність соку листя уражених рослин, %, ± до контролю	3,3-11,6	12,0-27,0

Умовні позначення: бс - симптоми відсутні; L - локальна реакція; S - системна реакція; LCu - закручування листя верхівки; Dis - деформація листків; LTW - кучерявість; Ne - некрози; VC - просвітління жилок; M - мозаїка; SI - слабкі симптоми; St - відставання в рості.

Таблиця 3

Результати аналізу здорових і інфікованих MBK пробіркових рослин картоплі сорту Луговська

Варіанти дослідів	Проявлення симптомів	Результат діагностики	Урожай, г/кущ
Пробіркові рослини (розсада)			
Контроль-здорові	бс	бв	197,0
Заражені M139	бс	MBK 100%	188,0

Заражені M200 HCP <sub>05</sub>	Lcu	MBK 100%	73,0 12,0
Рослини 1ї бульбової репродукції			
Контроль-здорові	бс	MBK 7%	440,0
Заражені M139	бс	MBK 100%	420,0
Заражені M200 HCP <sub>05</sub>	LCu. St	MBK 100%	238,0 32,0
Рослини 3ї бульбової репродукції			
Контроль-здорові	бс, Lcu	MBK 73,8%	545,1
Заражені M139	бс, LCuSI	MBK 100%	556,1
Заражені M200 HCP <sub>05</sub>	LTW, St	MBK 100%	175,3 28,4

Умовні позначення: бв - віруси не виявлені; бс - рослини безсимптомні; LCu - закручування листків верхівки; LTW - кучерявість; SI - слабкі симптоми; St - відставання в рості.

Представлені в таблицях характеристики відповідають паспортним даним штамів MBK : M139 - слабопатогенний, M200 - сильнопатогенний (Патент Україна 20194 С12N7/00 Штам М-вірусу картоплі для виробництва діагностичної сироватки 4469127/SU. - 29.07.88. (ІСГМ УААН); Патент Україна 20195 С12N7/00 А 01 N 63/00, 01.08.88, 25.12.97. Штам S-вірусу картоплі для одержання діагностичних сироваток (ІСГМ УААН).

Приклад 3.

Використання рослин-носіїв вірусів культури *in vitro* для накопичення антигена.

Розроблено методику використання рослин-носіїв вірусів культури *in vitro* для накопичення антигена для подальшого виробництва імунодіагностиків.

Для виготовлення інфекційного інокулюму 3-5 пробіркових рослин гомогенізували з додаванням 5 мл 0,01М К-фосфатного буферного розчину, pH7,4. Об'єм інокулюму достатній для зараження 20-25 рослин-накопичувачів. Ефективність зараження MBK та SBK рослин томату, наприклад, становила 51-57% за результатами серологічного аналізу.

Для підвищення ефективності інокуляції (до 78-100%) уражені від пробіркових рослин картоплі рослини томату використовували як проміжну стадію для послідовного зараження партії рослин томату і накопичення вірусного матеріалу. Крім того, підвищенню ефективності передачі вірусів сприяло використання для виготовлення інокулюму листя рослин, що вирости в ґрунті з мікробульб рослини-носія, або підрощених в ґрунті пробіркових рослин-носіїв вірусів.

Таким чином, розроблений процес довгострокового культивування фітопатогенних вірусів в рослинах культури *in vitro* забезпечує стабільність характеристик вірусів.

З використанням пробіркової культури картоплі та рослин-індикаторів створено колекцію штамів і ізолятів фітопатогенних вірусів, виділених в природних умовах України. Матеріал використовується при виконанні дослідницьких робіт, а також для накопичення антигена і послідовного виробництва імунодіагностиків.