

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю  
Кафедра Екологічної безпеки та охорони праці**

**«До захисту в ЕК»**  
Директор інституту (декан факультету)  
\_\_\_\_\_ Грегірчак Н.М. \_\_\_\_\_  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«12» \_\_\_\_\_ лютого \_\_\_\_\_ 2021 р.

**«До захисту допущено»**  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Семенова О.І. \_\_\_\_\_  
(підпис) (прізвище та ініціали)

«12» \_\_\_\_\_ лютого \_\_\_\_\_ 2021 р.

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА  
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА**

зі спеціальності \_\_\_\_\_ 101 «Екологія» \_\_\_\_\_  
(код та назва спеціальності)

освітньо-професійної програми \_\_\_\_\_ «Екологія та охорона навколишнього середовища» \_\_\_\_\_

на тему: \_\_\_\_\_ Дослідження властивостей вірусу тютюнової мозаїки \_\_\_\_\_

Виконав: здобувач II курсу, групи 3М

\_\_\_\_\_ Миненко Ангеліна Вячеславівна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я, по батькові повністю)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Керівник \_\_\_\_\_ Бублієнко Наталія Олександрівна \_\_\_\_\_  
(прізвище, ім'я та по батькові повністю)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Консультанти \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

\_\_\_\_\_ (прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Рецензент \_\_\_\_\_ Ющенко Н. М. \_\_\_\_\_  
(прізвище та ініціали)

\_\_\_\_\_ (підпис)

Засвідчую, що в цій кваліфікаційній роботі немає запозичень із праць інших авторів без відповідних посилань.

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Київ – 2021 р.

# НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Інститут (факультет) Біотехнології та екологічного контролю

Кафедра Екологічної безпеки та охорони праці

Освітній ступінь магістр

Спеціальність 101 «Екологія»

(код і назва)

Освітньо-професійна програма «Екологія та охорона навколишнього середовища»

(назва)

## ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри доц. Семенова О.І.

“ 27 ” жовтня 2020 року

## ЗАВДАННЯ

### НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА

Миненко Ангеліни Вячеславівни

(прізвище, ім'я, по батькові)

1. Тема роботи Дослідження властивостей вірусу тютюнової мозаїки

керівник роботи доцент кафедри екологічної безпеки та охорони праці,  
кандидат технічних наук, доцент Бублієнко Н. О.

(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)

затверджені наказом закладу вищої освіти від “26” жовтня 2020 року №868к

2. Строк подання здобувачем роботи 01 лютого 2021 р.

3. Вихідні дані до роботи рослини тютюну *Nicotiana tabacum*, зразки рослин-індикаторів, комерційні тест-системи виробництва Loewe (Німеччина).

4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити).  
Вступ, Розділ 1. Вірус тютюнової мозаїки, що циркулює в Україні, Розділ 2. Об'єкти та методи досліджень, Розділ 3. Експериментальна частина, Висновки. Перелік використаних джерел.

5. Перелік графічного матеріалу \_\_\_\_\_

## 6. Консультанти розділів роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_ 27.10.2020 р. \_\_\_\_\_

## КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№	Назва етапів виконання кваліфікаційної роботи	Строк виконання етапів роботи	Примітка
	Вступ	29.10.2020– 04.11.2020	Виконано
	Розділ 1. Вірус тютюнової мозаїки, що циркулює в Україні	05.11.2020 27.11.2020	Виконано
	Розділ 2. Об'єкти та методи досліджень	27.11.2020– 06.12.2020	Виконано
	Розділ 3. Експериментальна частина	08.12.2020– 11.01.2021	Виконано
	Висновки. Перелік використаних джерел	12.01.2021– 28.01.2021	Виконано
	Презентація	29.01.2021– 01.02.2021	Виконано

Здобувач \_\_\_\_\_  
(підпис)

Керівник роботи \_\_\_\_\_  
(підпис)

Миненко А. В.  
(прізвище та ініціали)

Бублієнко Н. О.  
(прізвище та ініціали)

## АНОТАЦІЯ

*Миненко А. В.* Дослідження властивостей вірусу тютюнової мозаїки. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 101 «Екологія» (ОПП «Екологія та охорона навколишнього середовища»). – Національний університет харчових технологій МОН України, Київ, 2021.

Нові штами представляють собою вихідний матеріал для еволюції вірусів. Оскільки РНК-вмісним вірусам бракує механізму виправлення помилок під час реплікації геному, тому часто можна спостерігати утворення ними мутантів, внаслідок нуклеотидних змін.

Робота присвячена дослідженню вірусу тютюнової мозаїки, який уражає рослини на території України, та вивченню його біологічних властивостей. Дослідження штамового різноманіття шкодочинних вірусів, розробка надійних методів їх діагностики є актуальним сьогодні для вирішення ряду як теоретичних, так і прикладних завдань.

**Наукова новизна** роботи: дослідженням було доведено, що ізоляти вірусу тютюнової мозаїки рослин є потенційно небезпечними через здатність інфікувати цінні сільськогосподарські види. Проведений комплексний аналіз надасть змогу підтвердити інформацію стосовно ВТМ та проаналізувати теперішні способи його розповсюдження з метою покращення боротьби з ними.

**Практичне значення** – врахування висновків наукового дослідження щодо вірусу тютюнової мозаїки зменшать негативний вплив вірусу на біологічні об'єкти.

**Ключові слова:** ВІРУСОЛОГІЯ, ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ, ЛОКАЛІЗАЦІЯ ВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ, МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ, РОСЛИНИ ІНДИКАТОРИ, ПАТОГЕН, РНК-ВІРУС, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, ТОБАМОВІРУС.

## SUMMARY

Minenko A. V. Investigation of the properties of tobacco mosaic virus – Qualifying scientific work is on the rights of the manuscript.

Qualifying work on the receipt of educational master's degree after speciality a 101 «Ecology» («Ecology and guard of environment»). – National University of Food Technologies, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

New strains are the starting material for the evolution of viruses. Because RNA-containing viruses lack a mechanism for correcting errors during genome replication, they can often be observed to form mutants due to nucleotide changes.

The work is devoted to the study of tobacco mosaic virus, which infects plants in Ukraine, and the study of its biological properties. The study of strain diversity of harmful viruses, the development of reliable methods for their diagnosis is relevant today to solve a number of both theoretical and applied problems.

**The scientific novelty of the work** is that tobacco mosaic virus isolates of plants are potentially dangerous due to their ability to infect valuable agricultural species. The comprehensive analysis will allow to confirm the information on TMV and to analyze the current ways of its distribution in order to improve the fight against them.

**Of practical importance** - taking into account the findings of scientific research on the tobacco mosaic virus will reduce the negative impact of the virus on biological objects.

**Key words:** VIRUSOLOGY, TOBACCO MOSAIC VIRUS, LOCALIZATION OF VIRAL INFECTION, RESEARCH METHODS, PLANTS INDICATORS, PATHOGEN, RNA VIRUS, IMMUNE ENZYME ANALYSIS, TOBAMOVIRUS.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ .....</b>	<b>7</b>
<b>ВСТУП.....</b>	<b>8</b>
<b>РОЗДІЛ 1</b>	
<b>ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ, ЩО ЦИРКУЛЮЄ В УКРАЇНІ</b>	
1.1 Вірусні хвороби рослин України.....	12
1.2 Історичне відкриття вірусу тютюнової мозаїки.....	14
1.3 Вплив вірусу тютюнової мозаїки на рослини.....	15
1.4 Модельна система «тютюн —вірус тютюнової мозаїки» .....	17
<b>РОЗДІЛ 2</b>	
<b>ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	
2.1 Об'єкт досліджень .....	19
2.2 Методи діагностики вірусів рослин .....	24
2.2.1 Біологічний метод діагностики .....	25
2.2.2 Метод імунодіагностики .....	28
2.2.3 Діагностика вірусів за допомогою електронної мікроскопії .....	32
2.2.4 Електронно-мікроскопічні дослідження .....	33
2.2.4.1 Приготування ультратонких зрізів рослинних зразків .....	34
2.2.4.2 Контрастування ультратонких зрізів .....	35
2.3 Статистична обробка результатів .....	35
<b>РОЗДІЛ 3</b>	
<b>ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА</b>	
3.1 Аналіз електронно-мікроскопічних зображень ультратонких зрізів тютюну, інфікованого	ВТМ
.....	37

3.2	Біологічне	тестування	рослин-індикаторів	
.....				43
3.3	Профілактичний	захист	рослин	від
ВТМ.....				45
<b>ВИСНОВКИ.....</b>				<b>48</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....</b>				<b>50</b>

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

<b>ICTV</b>	International Committee for Taxonomy of Viruses
<b>АПК</b>	Агропромисловий комплекс
<b>ВЖКЯ</b>	Вірус жовтої карликовості ячменю
<b>ВЗКМО</b>	Вірус зеленої крапчатої мозаїки огірку
<b>ВМЛ</b>	Вірус мозаїки люцерни
<b>ВМЯ</b>	Вірус мозаїки яблуні
<b>ВОМ</b>	Вірус огіркової мозаїки
<b>ВОМ</b>	Вірус огіркової мозаїки
<b>ВПЗТ</b>	Вірус плямистого зів'янення томатів
<b>ВСЛК</b>	Вірус скручування листя картоплі
<b>ВСМП</b>	Вірус смугастої мозаїки пшениці
<b>ВТМ</b>	Вірус тютюнової мозаїки
<b>ВШМЯ</b>	Вірус штрихуватої мозаїки ячменю
<b>ДНК</b>	Дезоксирибонуклеїнова кислота
<b>ІФА</b>	Імуноферментний аналіз
<b>НААН</b>	Національна академія аграрних наук
<b>РНК</b>	Рибонуклеїнові кислоти
<b>УВК</b>	У-вірус картоплі
<b>УФС</b>	Ультрафіолетове світло
<b>ФАО</b>	Продовольча та сільськогосподарська організація ООН (англ. Food and Agriculture Organization, FAO)
<b>ФВК</b>	Розчин фосфорно-вольфрамової кислоти

## 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.

Значну увагу 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.

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.

**Актуальність теми.** Поширеність захворювань рослин вірусної етіології в агро- та біоценозах України набуває все загрозливіших форм та наслідків. Культивування одного виду сільськогосподарських рослин протягом тривалого часу створює оптимальні умови для збільшення різноманітності і накопичення

вірусів рослин в агроценозах, що становить загрозу подальшого неконтрольованого поширення вірусних інфекцій на інші території.

Відсутність систематичного моніторингу за фітовірусними інфекціями призводить до неможливості прогнозування розповсюдження захворювань та врахування спричинених ними втрат врожаю.

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) є унікальним у багатьох співвідношеннях. Він був першим з відкритих вірусів, саме його було першим викристалізовано та виділено у чистому вигляді, на ньому вперше було відкрито існування субодиниць і показано, що інфекційність вірусу пов'язана тільки з нуклеїною кислотою. Саме ВТМ уперше розділено на білок та інфекційну РНК і знову відтворено вірус із цих компонентів. Є першим вірусом, в якому розшифровано послідовність амінокислотних залишків у пептидному ланцюгу білкової молекули.

Зважаючи на актуальність вивчення вірусів рослин, метою даної роботи було дослідити різноманітність та розповсюдженість фітовірусів серед вищих та нижчих рослин, які є ендемічними для України.

Було досліджено зразки рослин на наявність антигенів фітовірусів, таких як вірус тютюнової мозаїки. В зразках рослин *Nicotiana tabacum* були детектовані антигени вірусів, які належать до різних таксономічних груп, а саме вірус тютюнової мозаїки.

**Мета кваліфікаційної роботи** здійснення екологічного аналізу впливу на рослини тютюну вірусу тютюнової мозаїки, що циркулює в Україні.

Для виконання поставленої мети вирішувались такі завдання:

- збір інформації щодо впливу ВТМ на рослини тютюну;
- використання різних методів діагностики ВТМ;
- аналіз зібраних даних для подальшого зменшення розповсюдження ВТМ;
- розробка профілактичних дій проти ВТМ.

**Об'єкт дослідження** – вірус тютюнової мозаїки.

**Предмет дослідження** – вплив ВТМ на рослини тютюну.

**Методи досліджень.** Діагностика вірусів є однією з важливих завдань у загальній системі захисних заходів. Для дослідження біологічних властивостей вірусу тютюнової мозаїки був застосований метод біологічного тестування рослин-індикаторів та імуноферментний аналіз. Для статистичної оцінки значущості отриманих результатів застосовували метод бутстреп-аналіз (Bootstrap).

**Наукова новизна роботи:** дослідження довели, що ізоляти вірусу тютюнової мозаїки рослин, що циркулюють на території України, є потенційно небезпечними через здатність інфікувати цінні сільськогосподарські види. Проведений комплексний аналіз надасть змогу підтвердити інформацію стосовно вірусу тютюнової мозаїки та проаналізувати теперішні способи його розповсюдження з метою покращення боротьби з ними.

**Практичне значення** – врахування висновків наукового дослідження щодо вірусу тютюнової мозаїки зменшать негативний вплив вірусу на біологічні об'єкти.

**Особистий внесок здобувача.** Кваліфікаційна робота є самостійною роботою автора. Здобувачем проведено аналіз вірусу тютюнової мозаїки, що циркулює на Україні, узагальнено отримані дані, сформовано висновки і рекомендації.

Дослідження були проведені у відділі агроєкології і біобезпеки, Інституту агроєкології та природокористування НААН (консультант: кандидат біологічних наук Цвігун Вікторія Олександрівна).

Планування роботи, аналіз отриманої інформації, розроблення рекомендацій здійснювали за безпосередньої участі наукового керівника к. т. н., доцента Бублієнко Н. О.

**Структура та обсяг кваліфікаційної роботи.** Магістерська робота складається із вступу, 3 розділів, висновків, списку використаних джерел. Магістерська робота викладена на 51 сторінках, містить 2 таблиці та 14 рисунків, використано 12 найменувань літературних джерел.

# РОЗДІЛ 1

## ВІРУС ТЮТЮНОВОЇ МОЗАЇКИ, ЩО ЦИРКУЛЮЄ В УКРАЇНІ

### 1.1 Вірусні хвороби рослин України

Вірусні хвороби притаманні не лише людям і тваринам. У світі рослин так само можуть траплятись епідемії вірусної природи, здатні спричинити значні ресурсні та економічні втрати у сільському та лісовому господарстві. За даними ФАО, втрати врожаю сільськогосподарських культур від хвороб, збудником яких є віруси, можуть сягати 40 % і мати непередбачувані наслідки.

З урахуванням екологічної, наукової та соціальної значущості біологічної безпеки в АПК як важливої умови збалансованого розвитку України. Виробництва якісної продукції харчування лісове та сільське господарства мають базуватися передусім на використанні якісного безвірусного сертифікованого посівного матеріалу, стійких сортів. Тому актуальним є питання створення депозитарію основних вірусів, які уражають сільськогосподарські і лісові культури та наукового центру «Вірус», що й було ініційовано на засіданні Бюро Президії Національної академії аграрних наук України 18 вересня 2019 року. <sup>1</sup>

Зважаючи на розвиток нових молекулярних методів і можливостей біотехнологічної науки, біологічна безпека стає невід'ємною складовою екологічної, а отже і національної безпеки. Відтак особливої актуальності набуває питання фітовірусології в аграрному виробництві, а саме – розповсюдження, накопичення, поява нових видів та резистентних форм вірусів в агроценозах і лісових екосистемах.

Нині міжнародним комітетом з таксономії вірусів (*International Committee for Taxonomy of Viruses, ICTV*) зареєстровано більше 1000 видів вірусів, що уражують рослини. Зважаючи на важливість сільськогосподарської продукції та

лісових екосистем для господарювання і в майбутньому для компенсації наслідків зміни клімату, необхідно розширювати дослідження вірусів рослин.<sup>2</sup>

Адже, за даними НААН, середні втрати врожаю на території України від вірусних інфекцій можуть сягати: для зернових культур від вірусу жовтої карликовості ячменю 60,2 – 95,5 %, від вірусу смугастої мозаїки для пшениці – 20,4 – 63,1 %; від вірусу мозаїки сої для бобових культур – 25,8 – 67,3 %, від вірусу карликовості сої – 10,8 – 45,6 %. Для овочевих культур, які уражуються вірусом огіркової мозаїки, врожайність знижується від 3,3 % до 80,2 %, для картоплярства від Y-вірусу картоплі врожайність втрачається на рівні 3,8 – 79,5 %, від X – вірусу картоплі втрати сягають від 39,6 до 52,1 %, вірусом тютюнової мозаїки – на 38,6 – 57,3 %. Плодові культури уражує вірус шарки сливи, який є карантинним видом на території України, і втрати врожаю складають 30,1 – 53,1 %, вірус кільцевої плямистості вишні – втрати на рівні 25,2 – 43,5 %, вірус коротковузля винограду – втрати врожаю на рівні 20,3 – 40,6 %.<sup>1</sup>

Вірусна інфекція негативно впливає на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у рослинах. Зокрема, продуктивність кушіння в уражених зернових рослинах на 72 – 95 % є нижчою, ніж у здорових, кількість зерен у колосі та їхня маса знижуються на 29,2 – 54,5 %. Зменшується вміст хлорофілу й каротиноїдів, порушується процес утворення зерна та погіршується його якість. У бобових рослин знижується здатність до азотофіксації, погіршується теплостійкість рослин. У буряків, уражених вірусом мозаїки буряку, цукристість коренеплодів у середньому нижча на 1,7 – 2 %. X – вірус картоплі знижує вміст крохмалю в бульбах картоплі до 2 %.

Віруси рослин мають здатність досить швидко розповсюджуватися в біоценозах. Вони можуть поширюватися завдяки механічному контакту рослин, під час вегетативного розмноження через бульби, живці, цибулини, комахами (кліщами, попелицями, нематодами, грибами).

Вірусні хвороби можуть передаватися також через ґрунт. Вірусні частки від 10 до 40 діб можуть міститися у відмерлих рештках рослин. Скажімо, вірус огіркової мозаїки (ВОМ) зберігається упродовж 29 діб, Х-вірус картоплі (ХВК) – 25, вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) – 39 діб. <sup>3</sup>

Знання характеристик вірусу (ідентифікація вірусів) та його інфекційного процесу є першими кроками з розроблення відповідних фітосанітарних стратегій для виробництва рослин на безвірусній основі та підвищення рівня продуктивності аграрного і лісового секторів економіки.

### **Фітопатогенні віруси, що циркулюють на території України:**

- зернові культури – вірус жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ), вірус смугастої мозаїки пшениці (ВСМП), вірус штрихуватої мозаїки ячменю (ВШМЯ);
- бобові культури – вірус мозаїки люцерни (ВМЛ), вірус жовтої мозаїки квасолі (ВЖМК);
- овочеві культури – вірус тютюнової мозаїки (ВТМ), вірус огіркової мозаїки (ВОМ), вірус плямистого зів'янення томатів (ВПЗТ) ;
- цукрові буряки – вірус жовтяниці цукрових буряків (ВЖБ), вірус мозаїки цукрових буряків (ВМБ);
- картопля – У-вірус картоплі (УВК), Х-вірус картоплі, вірус скручування листя картоплі (ВСКЛ);
- плодові – вірус мозаїки яблуні (ВМЯ). <sup>4</sup>

Таким чином, фітовіруси широко розповсюджені в різних регіонах нашої планети. В умовах України вони мають відповідні шляхи передачі, комах–переносників та коло рослин–господарів, що і зумовлює їх особливості циркуляції в біоценозах та епідеміологічні особливості їх характеристик.

## **1.2 Історичне відкриття вірусу тютюнової мозаїки**

Пріоритет відкриття вірусів належить видатному вченому Д. Й. Івановському. Ще при навчанні в Петербурзькому університеті став вивчати мозаїчну хворобу тютюну, що приносила шкоду сільському господарству. Ними було встановлено, що описана в Голландії А. Мейером мозаїчна хвороба тютюну представляє собою не одне, а два різних захворювання однієї і тієї ж рослини, одне з яких – рябуха (збудником якої є плісневий гриб), а друге власне мозаїчна хвороба тютюну невідомого походження. Вивчення природи цього захворювання Д.Й. Івановським привело до відкриття першого вірусу. Краплиною соку, що була взята зі хворої рослини, Д.Й. Івановський інфікував здорову рослину і викликав дане захворювання. Тоді Д.Й.Івановський вирішив профільтрувати сік через фарфорові фільтри, через які бактерії не проходять. Профільтрований сік викликав мозаїчну хворобу у здорових рослин через 15 днів після інфікування.

Швидкими темпами після робіт Д.Й. Івановського було встановлено, що віруси поширені у природі і можуть викликати не тільки захворювання рослин, а й у людини та тварин.<sup>5</sup>

Уявлення про природу вірусів суцільно змінилися в 1935 році, коли американський біохімік У. Стенлі уперше отримав чистий препарат вірусу тютюнової мозаїки у вигляді кристалічного білку.

Приготованим з кристалів білку розчином можна було заразити рослини, тому Стенлі зробив висновок, що віруси складаються з білку. Це відкриття привело до уявлення, що віруси фактично є не живими організмами, а радше хімічними об'єктами. Через рік англійські біохіміки Ф. Боуден і Н. встановили, що на 94 % вірус тютюнової мозаїки складається з білку, а на 6 % – з нуклеїнової кислоти. Отже, було показано, що вірус насправді є нуклеопротеїном, що містить РНК.

### **1.3 Вплив вірусу тютюнової мозаїки на рослини**

Безліч всіляких рослин існує на земній кулі. Однак багато хто з них схильні до різних захворювань, які негативно впливають на процеси їх життєдіяльності, а також зовнішній вигляд. Одним з поширених захворювань рослин є вірус тютюнової мозаїки.

Тютюнова мозаїка (*Tabaco mosaic virus*) – це вірус, який заражає різні культури, оселившись в їх тканинах. Найбільш часто від нього страждають пасльонові рослини (перець, огірки, томати і тютюн).

Вірус руйнує клітини рослини, знищуючи хлорофіл і приводячи до порушення фотосинтезу, знижується рівень вуглеводів, що призводить до відмирання ділянок тканини. Через це на поверхні листа можуть з'явитися:

- розриви в формі мозаїки смарагдово-рожевого відтінку;
- бугристість через посилення процесу поділу клітин;
- плямистість різних відтінків зеленого кольору.

ВТМ знищити практично не можливо. Після потрапляння вірусу в ґрунт він може завдавати шкоди різним культурам протягом п'яти років. Характер дії вірусу призводить до того, що шкірка уражених рослин стає дуже тонкою і хвороботворні бактерії можуть без труднощів проникнути всередину. Клітини рослини, з низьким рівнем поживних речовин, органічних кислот і глюкозою, починають поступово руйнуватися і відмирати, що негативно впливає на врожайність. Плоди дозрівають в меншій кількості, але і ті дрібні і неповноцінні.

Вірус тютюнової мозаїки вражає здорові рослини за допомогою проникнення в них через сік заражених культур. Це може статися при:

- використання насіння, зараженого цим вірусом;
- присутності в ґрунті різних сисних шкідників: нематод, кліщів, які передають вірус разом зі своєю зараженою слиною іншим рослинам;

- пікіруванні, прищипуванні, пасинкуванні і пересадці культур (ураженню піддаються ранки коренів і пагонів);
- попаданні соку рослин на інвентар, за допомогою якого їх обробляють, пошкоджуючи волоски і завдаючи рани поверхні стебел і листя.

ВТМ може поширюватися де завгодно. Якщо він вже потрапив на ділянку, то повністю знищити його практично неможливо. Саме основне – це вчасно перешкодити його поширенню. Для цього слід дотримуватися профілактичних заходів, що особливо актуально в період вегетації рослини.

Умови навколишнього середовища, сприятливі для розвитку – це помірна температура (але не нижче 10 ° С), у міру підвищення температури ступінь ураженості знижується, а при 35 ° С спостерігається маскування симптомів. Залежно від температури може змінюватися і тип симптомів. Тютюнова мозаїка не гине навіть в зимовий період, нападаючи на кореневу систему деяких бур'янів.

#### **1.4 Модельна система «тютюн – вірус тютюнової мозаїки»**

Історично тютюн (*Nicotiana tabacum*) вважається первинним господарем вірусу тютюнової мозаїки і тому взаємодія двох даних організмів є еталонною з точки зору дослідження розвитку вірусних симптомів на макрорівні, фізіологічної відповіді (в тому числі захисної) рослини на інфекцію, а також гісто- та цитопатології рослин під дією вірусного агента. Інфікування сприйнятливих до ВТМ сортів та видів тютюну (наприклад, сортів *Samsun*, *Трапезунд*, *Xanthi nc*) супроводжується розвитком системної вірусної інфекції.

Симптоматика на рівні рослини в нормі включає в себе загортання кінчиків наймолодоших справжніх листків (на 7 – 10 день після інокуляції) та наступний розвиток на них мозаїчних симптомів (на 14 – 20); типово мозаїка представлена чергуванням світло- та темнозелених ділянок на листку, іноді – жовтих та

зелених зон. У подальшому мозаїчні симптоми поширюються на старіші листки. Таким чином захворювання набуває системного (генералізованого) характеру.

Надалі, в залежності від штаму ВТМ, концентрації інокуляту, та сорту й фізіологічного стану рослини, мозаїка може супроводжуватися розвитком помірної або суворої деформації листків (на 30 – 40 д.п.і.). Приведено класичний варіант розвитку подій, симптоми можуть дещо варіювати у прояві та часі появи. Слід зазначити, що у більшості випадків хворі рослини тютюну залишаються симптоматичними протягом дуже тривалого періоду, найчастіше – до кінця вегетації та дозрівання насіння.

Паралельно з розвитком симптомів зазвичай відбувається прогресивне накопичення вірусу у рослинних тканинах. У випадку модельної системи «тютюн-ВТМ», основна маса новосинтезованого патогена зосереджена в зеленій (фотосинтезуючій) листовій тканині – мезофілі. Віріони ВТМ також масово детектують у флоемі під час генералізації інфекції (системного транспорту) на більш пізніх етапах інфекції (10 – 30 д.п.і.) та іноді у коренях рослин.<sup>6</sup>

За стандартних умов системної інфекції динаміка накопичення ВТМ у рослині тютюну на вигляд подібна типовій кривій росту бактеріальної культури на поживному середовищі: на перших етапах інфекції (1 – 7 д.п.і.) відбувається повільне накопичення вірусних антигенів, яке супроводжується стрімким ростом їх концентрації у рослинних тканинах (5 – 20 д.п.і.), досягненням пікового вмісту (стадія «плато») та подальшим поступовим зниженням вмісту ВТМ у рослині до певного базального рівня (часто еквівалентного вмісту вірусу у першу-другу добу зараження). Практично завжди рослина залишається прижиттєвим носієм вірусу.

Вибір модельної системи «тютюн – вірус тютюнової мозаїки», таким чином, пояснюється наявними вичерпними відомостями як щодо обох модельних об'єктів, так і стосовно їх взаємодії.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Об'єкт досліджень

Об'єкт дослідження – вірус тютюнової мозаїки.

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) 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.

Вірус тютюнової мозаїки (ВТМ) належить до роду *Tobamovirus*. 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 вперше розділено на білок та інфекційну РНК і знову ж відтворено вірус із цих же компонентів. ВТМ є першим вірусом, в якому розшифровано послідовність амінокислотних залишків у пептидному ланцюзі білкової молекули.

За сучасними даними, ВТМ має форму порожнього циліндра діаметром 15 нм і завдовжки 300 нм. Віріон ВТМ містить одноланцюгову (+) РНК, його капсид складається з однакових, спірально розміщених білкових субодиниць.

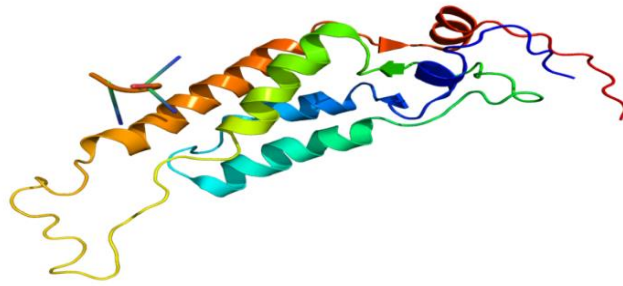


Рисунок 2.1 – Білок оболонки вірусу тютюнової мозаїки.

У кожній спіралі на три витки припадає 29 субодиниць, кожна з яких є білковою молекулою з молекулярною масою 17 530 (рис 2.1, 2.2).<sup>7</sup>

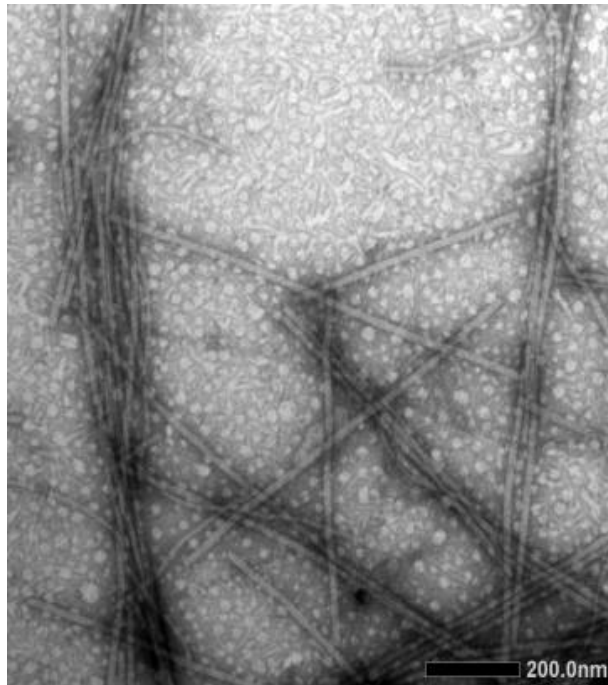


Рисунок 2.2 – Електронномікроскопічне зображення вірусу тютюнової мозаїки

Загалом віріон містить 2130 ( $\pm 2$  %) ідентичних білкових субодиниць (рис. 2.3).



Рисунок 2.3 – Геном вірусу тютюнової мозаїки

Фізико–хімічні властивості вірусу: плавуча густина в CsCl дорівнює 1,325 г/см<sup>3</sup>, частки легко руйнуються в присутності нейтральних солей хлоридів і додецилсульфату натрію. Основний з S<sub>20W</sub> – 194 S. Ізоелектрична точка знаходиться в межах рН 3,5. Температурна точка інактивації вірусу в соці при нагріванні протягом 10 хвилин становить 90 °С.

При ранньому ураженні рослини відстають у рості, втрати врожаю перевищують 30 – 40 %. При більш пізньому ураженні мозаїка може бути різко вираженою, але рослини розвиваються, цвітуть і плодоносять. На стиглому листі тютюну ознаки хвороби можуть зникати, хоча рослина буде інфікована вірусом. Втрати врожаю в цих випадках становлять 10 – 15 %. Стійкий сорт тютюну «Імунний – 580».

Збудником хвороби є *Tabaco mosaic virus (Nicotiana virus 1 Smith)*, який уражує всі пасльонові культури. Від рослини до рослини вірус передається механічно. Переносником його може бути також попелиця.

Вірус тютюнової мозаїки передається також насінням і зберігається у сухих або неповністю згнилих рештках рослин.

Шкідливість хвороби полягає в погіршенні транспірації в рослинах, зниженні їх росту й інтенсивності цвітіння. При цьому квітки і пуп'янки засихають, а у плодах відкладається мало цукрів та органічних кислот. Все це призводить до зниження врожаю – плодів формується менше і вони невеликого

розміру. При ранньому розвитку тютюнової мозаїки недобір урожаю у теплицях становить близько 50 %, а у відкритому ґрунті – 10 – 15 %.

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». <sup>8</sup>

Циркуляція ВТМ: взимку – зберігання в ґрунті, воді, багаторічних рослинах (подорожник, мак), рослинних залишках, однорічних бур'янах (лобода, дурман), незбираному гарбузинні, коренеплодах буряків, навесні – механічна передача при обробці ґрунту, неспецифічна механічна передача комахами з гризучим апаратом; передача між рослинами. Влітку – період найбільшого розмноження, пов'язаний з температурою, вологістю та збільшенням біомаси рослин (картопля, томати, тютюн, перець), співіснування сільськогосподарських рослин та бур'янів, восени – розповсюдження переважно серед бур'янів.

ВТМ-інфекція по-різному впливає на накопичення кислих глікобіополімерів у рослинах тютюну залежно від їхньої вірусостійкості. Різний характер реакції рослин на вірусну інфекцію обумовлений, вірогідно, тим, що у надчутливих рослинах, уражених вірусом, має місце утворення клітинних компонентів, які виконують регуляторні функції.

Таблиця 2.1 – Рослини, чутливі до ВТМ

Міжнародна наукова назва	Назва рослини
<i>Beta vulgaris</i>	Буряк
<i>Capsicum frutescens</i>	Стручковий перець
<i>Cucumis sativus</i>	Огірок
<i>Cucurbita pepo</i>	Гарбуз

<i>Lycopersicon esculentum</i>	Помідор
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Квасоля
<i>Solanum tuberosum</i>	Картопля
<i>Lactuca saliva</i>	Салат посівний
<i>Ch. hybridum</i>	Лобода
<i>D. stramonium</i>	Дурман звичайний
<i>Papaver rhoeas</i>	Мак дикий
<i>Physalis floridana</i>	Фізалис
<i>Plantago major</i>	Подорожник великий

У чутливих же рослинах «гіперсинтезу» піддаються продукти вірусного геному (табл. 2.1), безсимптомні рослини наведені у табл. 2.2 .

Таблиця 2.2 – Безсимптомні рослини

Міжнародна наукова назва	Назва рослини
<i>Avena sativa</i>	Овес посівний
<i>Helianthus annuus</i>	Соняшник
<i>Hordeum vulgare</i>	Ячмінь звичайний
<i>Pisum sativum</i>	Горох посівний
<i>Spinacia oleraceae</i>	Шпінат городній
<i>Triticum aestivum</i>	Пшениця м'яка
<i>Zea mays</i>	Кукурудза звичайна
<i>Daucus carota</i>	Морква дика
<i>Brassica campestris</i>	Капуста польова
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Грицики звичайні
<i>Dianthus barbatus</i>	Гвоздика бородата
<i>Salvia splendens</i>	Шавлія блискуча
<i>Solanum nigrum</i>	Паслін чорний

В якості індикаторних-рослин використовували рослин *Nicotiana tabacum*.

Тютюн справжній (*Nicotiana tabacum*) – вид рослин роду тютюн (*Nicotiana*).

Тютюн – світлолюбна рослина. При недостатньому освітленні у рослин сповільнюється накопичення сухих речовин, вуглеводів, змінюється текстура листя, знижується ароматичність сировини.

Корінь представників роду тютюн довгий, довжиною близько двох метрів, з добре вираженим стрижневим коренем.

Стебло пряме, округле, розгалужене. Листки великі, черешкові, або сидячі, суцільні, загострені, у багатьох видів з крилатками. Листки чергові, цілокраї, опушені, черешкові або без черешків, довжина листової пластинки від 12 см у мілколистових форм до 50 см у крупнолистових. Форма листової пластинки – від овальної до ланцетової. Розмір листя значно змінюється залежно від умов зростання, проте зберігається характерне співвідношення довжини до ширини: від 1,2 – 1,3 у європейських сортотипів до 2,2 – 2,5 у американських крупнолистових. Кількість листів на рослині коливається від 16 до 50 і більше. Забарвлення листа від жовто-зеленої до темно-зеленою, вміст нікотину в листі від 0,5 до 3,0 %.

Суцвіття – волоть, щіткоподібне. Квітки тютюну двостатеві, з 5–лопатевою чашечкою і воронкоподібним віночком, білого, рожевого або червоного забарвлення, тичинок п'ять. Стовпчик маточки простий, з голівчатим рильцем, двогніздовою верхньою зав'яззю, оточений біля основи нектарником. Тютюн має тривалий період цвітіння, тому в місцях вирощування може дати бджолам значну кількість нектару. Мед гіркий на смак, і не придатний як харчовий продукт, але бджоли на ньому можуть зимувати.

Плід – багатонасінна коробочка, при дозріванні розтріскується.

Насіння овальне, довгасте, коричневого забарвлення різних відтінків, дуже дрібні – довжина їх дорівнює приблизно 600 – 850 мікрон, ширина – 450 – 600 мікрон, 1000 штук насіння важать 0,06 – 0,08 г, число насіння в 1 г досягає 12 – 15 тисяч. В одній коробочці формується близько 2 – 4 тисяч насіння. Оболонка насіння комірчаста. Проростає майже все.

## **2.2 Методи діагностики вірусів рослин**

Найважливіша перевага мікророзмноження – одержання величезної кількості рослин – може перетворитися у дуже небезпечний недолік, якщо матеріал не буде перевірений на чистосортність і відсутність вірусів. Особливо велике економічне значення при масовому виробництві садивного матеріалу має діагностика вірусів на всіх етапах оздоровлення.

Ідентифікація за морфологічними ознаками зустрічає ряд труднощів, бо зовнішні ознаки вірусних захворювань іноді бувають схожі з неінфекційними фізіологічними аномаліями у рослин, що виникають внаслідок незбалансованого живлення або надмірної кількості мінеральних добрив тощо. Крім того, вірус може знаходитися в рослині в прихованому (латентному) стані і зовнішні ознаки не виявляються.

Фізичні і біологічні особливості вірусів потребують специфічних методів їх діагностики. Сучасний стан досліджень передбачає використання таких методів діагностики на наявність вірусів:

- метод електронної мікроскопії;
- індикаторний (біологічний) метод;
- метод імунодіагностики (імуноферментний аналіз).<sup>9</sup>

### **2.2.1 Біологічний метод діагностики**

Біологічний метод діагностики вірусів базується на використанні рослин-індикаторів. Це рослини, які чітко і специфічно реагують на ураження вірусом.

Індикаторних рослин багато, інколи по декілька для одного і того ж вірусу. Найбільш ефективні рослини–індикатори: лобода гігантська (*Chenopodium amaranticolor*), лобода рисова (*Chenopodium guinoa*), тютюн турецький (*Nicotinia tabacum*), квасоля звичайна (*Phaseolus vulgaris*), шпинат новозеландський (*Gomphrena globosa*), дурман (*Datura stramonium*) та ін. Лобода рисова відіграє у фітовірусологів роль не меншу, ніж кишкова паличка *E. coli* при вивченні бактеріофагів, а мавпа – в онкологічних захворюваннях. Ця рослина чутлива до 36 видів вірусів. Навіть вірус жовтухи (гепатиту) людини може уразити лободу з утворенням некрозів на її листках. Це може бути своєрідною діагностикою захворювання.

Рослини–індикатори вирощують ізольовано, в теплицях на стерильному ґрунті. Їх спочатку висівають у горщечки, які попередньо знезаражують 5 % марганцевокислим калієм. Встановлено, що рослини–індикатори чутливіші при температурі 20 – 25 °С і освітленості 8 – 10 тис. люкс. Такі рослини стають ще чутливішими, якщо їх витримати перед цим 36 – 48 год. у темряві.

Для зараження слід використовувати молоді рослини (фаза 1 – 2 листка). Рослини–індикатори (6 і більше) заражують механічно – шляхом натирання їх листків соком дослідних рослин за допомогою шпателя.

У плодових тест на наявність вірусів проводять на індикаторних рослинах шляхом подвійної окуліровки очками, у ягідних (суниця, малина, смородина) – методом щеплення зближенням або черешком листка.

Щоб зберегти інфекційність екстрактів, одержаних з хворої рослини, застосовують буферні розчини. Мацерацію тканини проводять у попередньо знезараженій ступці або гомогенізаторі. Як правило, рекомендується використовувати фосфатний буфер від 0,1 до 0,01 М, рН 6,5 – 7,0, тому що більшість вірусів інактивується при низькому значенні рН. При цьому до гомогенату рекомендується додавати активоване вугілля.

Після проведення інокуляції (через кілька хвилин) інокулюм з поверхні листків змивають водою, а рослини ставлять у затемнене місце на 12 – 24 год., щоб вони могли краще перенести зараження. Для більш швидкого одержання результатів потрібно застосовувати такі рослини-індикатори, які дають місцеву (локальну) реакцію. Якщо ж рослина-індикатор з місцевою реакцією невідома для конкретного передбачуваного вірусу, використовують рослини-індикатори з системною реакцією, на яких симптоми розвиваються на 7 – 10 день після зараження.

Спостереження за рослинами-індикаторами треба починати через 2 дні після зараження і проводити протягом 4 тижнів і більше. Ознаки локальної реакції проявляються, як правило, через 3 – 14 днів після інокуляції, системної – на 7 – 30 день.

Наприклад, при вивченні ультраструктурних змін у клітинах рослин, інфікованих вірусом хлоротичної кільцевої плямистості, виявлена локалізація в цитоплазмі хаотично розташованих вірусоподібних частинок, які відрізняються від рибосом дещо більшими розмірами і більш крилатими обрисами.

Інколи вірусоподібні частинки займають цитоплазматичний простір, відмічено їх зв'язок із цитоплазматичними мембранами. Під впливом вірусної інфекції порушується ультраструктура хлоропластів, відбувається їх вакуолізація.

**Матеріальне забезпечення:** здорові рослини тютюну *Nicotiana tabacum* у стадії 3–4 справжніх листків, вірус – вірус тютюнової мозаїки, абразив – карборунд (скляний пісок), скляні палички, 300 см<sup>3</sup> дистильованої води, фосфатний буферний розчин рН 7,4, стакани з дизрозчином, етикетки та макрери, 1 % водним розчином КМnO<sub>4</sub>.

Проводиться підбір рослин-індикаторів для досліду. Насіння рослин попередньо обробляли 1 % водним розчином КМnO<sub>4</sub> впродовж 15 хв. Після цього насіння обробляли дистильованою Н<sub>2</sub>О 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.

### **2.2.2 Метод імунодіагностики**

Основою імунодіагностичних методів є виявлення комплексу антиген-антитіло. Серед цих методів можна назвати реакцію преципітації в агаровому гелі, кальцепреципітацію, подвійну імунодифузію в агарі, латекс-тест та ін. Найбільш продуктивним і специфічним вважають твердофазний імуноферментний аналіз (ІФА), чутливість якого складає 4 – 15 нг/мл вірусу. Його можна застосовувати для ранньої діагностики вірусів як у рослинах, так і в посівному матеріалі.

Високо специфічні антитіла для проведення аналізу стандартні і входять до складу наборів. Їх окремо готують спеціалісти-імунологи за допомогою лабораторних тварин (кролі, морські свинки). При введенні в кров частково

очищеного рослинного вірусу у відповідь організм тварин виробляє антитіла, суворо специфічні саме для цього вірусу. До цих антитіл «пришивають» фермент пероксидазу, тобто мітять антитіла. Пероксидаза зручна тим, що утворює із субстратом чітке кольорове забарвлення, яке визначається інструментально або візуально.

Для аналізу використовують сік з листків, бічних корінців, паростків, бульб рослин. Якщо вірус, що тестується (антиген), присутній в рослині, то він взаємодіє з міченими антитілами. Утворюється забарвлений комплекс антиген-антитіло-субстрат, оптична густина якого пропорційна концентрації вірусу.

Цей метод діагностики має назву ELISA–тест – ферментативне визначення за допомогою імуносорбентів.

Практика свідчить, що додатково необхідні також експрес-методи перевірки рослин на бактеріози та деякі хронічні грибні інфекції (трахеомікози). Увесь комплекс діагностичних досліджень проводять тоді, коли мають справу з новою, мало вивченою хворобою, яка підозрюється як вірусна. Якщо ж вона добре вивчена, описана в літературі, то для встановлення вірусної природи проводять лише найнеобхідніші дослідження.

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.

Широко ввійшов в практику ІФА – метод фізичної адсорбції антигенів та антитіл на поверхні мікроплат із непористого полістиролу. Аналіз проводиться в 5 основних етапах: 1) фізична сорбція антитіл (або антигену)

на твердофазний носій; 2) імунологічна реакція: внесення антигену (або антитіл) в ті ж лунки; 3) імунологічна реакція (друге специфічне зв'язування): внесення комплексу кон'югат-фермент, хімічним шляхом зв'язаного з антитілом; 4) ензиматична реакція, коли фермент, діючи на субстрат, сприяє появі забарвленого комплексу; інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену (або антитіла) в лунках; 5) врахування результатів з допомогою приладів – абсорбціометрів, які дозволяють вимірювати оптичну густину продукту ферментативної реакції безпосередньо в лунках імунологічного планшету.

Таким чином, весь процес ІФА можна умовно розділити на три основні стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) і її візуалізація тим чи іншим фізичним способом.

Перед постановкою ІФА проводиться робота, яка включає наступні етапи: вирощування біологічно чистого матеріалу з моно інфекцією, отримання очищеного вірусного препаратів, приготування анти сироваток з високим титром специфічних антитіл, виділення IgG і кон'югування з ферментами.

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 контролю. Для статистичної достовірності кожен із дослідних зразків при постановці ІФА аналізувався у трикратній повторності. Результати реєстрували на автоматичному ІФА-аналізаторі Termo LabSystems Opsi 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.

При постановки непрямого ІФА ферментну мітку вносять в антитіла.

Формуючи комплекс АГ–Ат, імобілізований 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.

### **Постановка ІФА та непрямого імуноферментного аналізу**

**Матеріальне забезпечення:** Контроль здорових рослин тютюну *Nicotiana tabacum*, рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ, рослини тютюну *Nicotiana tabacum* із симптомами ВТМ, контроль для ІФА здорові рослини, контроль для ІФА ураженні рослини ВТМ, специфічні сироватки до ВТМ, антитіла мічені ферментом лужна фосфатаза, знежирене сухе молоко, карбонатний буфер, рН 9,6, 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 непрямого ІФА:

1. Наносили АГ в карбонатному буфері, рН 9,6 в концентрований вірусний препарат, сік огірка в розведенні 1:50 в якості негативного контролю та інкубуємо протягом ночі при +4 ° С.
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 °С.
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 кожному лунку по 0,11 см<sup>3</sup>. Інкубуємо 2 год при температурі 37 °С.
6. Відмиваємо 3 рази по 5 хв відмивочним буфером (0,1М PBS+ tween-20).

7. Наносимо АТ2 на буфері для розведення АТ. Як антивидові АТ використовували антикролячі АТ, конюговані лужною фосфатазою (“Dianova”, Німеччина). Інкубуємо 2 год при температурі 37 °С.

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 см<sup>3</sup> діетаноламіну довести до 1 дм<sup>3</sup> Н<sub>2</sub>О, НСІ до рН 9,8.). Як субстрат використовували N–п–нітрофенілфосфат, С=1мг/см<sup>3</sup>. Реакцію зупиняли 3М NaOH.

Схема нанесення зразків на плашку

	1	2	3	4
A	З№1	З№1	З№1	
B				К+
C	З№2	З№2	З№2	К+
D	З№3	З№3	0	К-
F				К-

**Буферні розчини для постановки Імуноферментного аналізу (ІФА)**

**Карбонатний буфер рН 9,6 на 20 см<sup>3</sup>.**

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 0,032 мкг

NaHCO<sub>2</sub> – 0,056 мкг

води – 20 см<sup>3</sup>.

**Буфер для нанесення АТ на 20 см<sup>3</sup> (непрямий ІФА)**

0.2 см<sup>3</sup> – сухого молока

5 см<sup>3</sup> – відмивки

15 см<sup>3</sup> – ( PBS) рН 7,4

**Блокуючий буфер (для непрямого ІФА)**

1 мкг сухого молока

1 см<sup>3</sup> PBS

### **Фосфатний буферний розчин ( PBS) рН 7,4**

NaCl – 8,0 г

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2 г

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \*12 H<sub>2</sub>O – 2,8 г

KCl – 0,2 г

Об'єм розчину доводимо до 1 дм<sup>3</sup> дистильованою водою

### **Стоп розчин 3М NaOH**

NaOH – 120 г

H<sub>2</sub>O – 1 дм<sup>3</sup>

### **Буфер відмивки**

1М PBS

0,2 % tween–20

## **2.2.3 Діагностика вірусів за допомогою електронної мікроскопії**

Форма і величина вірусів – надійний критерій їх ідентифікації за допомогою електронної мікроскопії. Електронний мікроскоп, що збільшує об'єкт у десятки тисяч разів, дозволяє побачити віруси, розміри яких коливаються в межах 20–450 нм (1 нм = 10<sup>-9</sup> м). Існують такі методи електронного мікроскопіювання:

- негативного контрастування;
- занурення;
- імуносорбентної електронної мікроскопії;
- інфрачервоної електроскопії;
- люмінесцентного аналізу.<sup>10</sup>

### **Матеріальне забезпечення**

**Посуд та інструменти:** чашки Петрі, леза, пінцет, препаративні голки, мікробіологічна петля, скляні ємкості для зразків з герметичними кришками,

скляні ємкості з притертими кришками для реактивів, скляні палички, градуйовані (мірні) пробірки, скляний шприц, прямі стакани на 50 см<sup>3</sup> з широким горлом, піпетки, молди, вата, фільтрувальний папір, сіточки або бленди для електронної мікроскопії.

**Реактиви:** 25 % глютаральдегід; какоділатний буфер, рН 7,2; 4 % тетраокис осмія (OsO<sub>4</sub>); 30 %, 70 %, 96 %, 100 % етиловий спирт (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH); зневоднена мідь (CuSO<sub>4</sub>) марки «хч»; ацетон марки «хч»; аралдит М; епон 812; ДДСА (додещинілянтарний ангідрит); ДМП 30 (2,4,6-трисдиметиламинометилфенол); дистильована вода (H<sub>2</sub>O); розчин формвару; ураніацетат (2,5 %), 0,02 Н цитрат свинцю.

**Обладнання:** рН–метр, ваги, вакуумна шафа, ламінарний бокс, термостат, бінокулярний мікроскоп, утримувач блоків, ультрамікротом, електронний мікроскоп.

#### **2.2.4 Електронно-мікроскопічні дослідження**

Аналіз сіточок зі зрізами рослинних тканин на електронному мікроскопі проводять за стандартних умов. Звичайно використовують інструментальне збільшення у діапазоні 10000–30000х. При належній якості зразку (оптимальна товщина зрізу, адекватне контрастування, гомогенність плівкипідкладки та зрізу на сіточці).

##### **2.2.4.1 Приготування ультратонких зрізів рослинних зразків**

Отриманий після полімеризації блок зі зразком фіксують у спеціальному утримувачі та звичайним гострим лезом або скальпелем зрізають зайву смолу на вершині блоку – готують площу у вигляді чотиригранної піраміди для подальшого нарізання ультрамікротомом. Дану маніпуляцію проводять під бінокулярним мікроскопом.

Безпосередньо ультратонкі зрізи з підготовленого блоку готуються за допомогою ультрамікротомного ножа. Існують скляні та діамантові ножі, для ультрамікротомії рослинних тканин рекомендуються останні. Ріжуча поверхня ножа зафіксована у тримачі з ємкістю з дистильованою водою, куди потрапляють зрізи (рис.2.4).



Рисунок 2.4 – Приклади ножів для ультрамікротомування. Виїмка зверху – ємкість для води

Методика ультрамікротомування прописується виробником мікротому. Для мезофілу тютюну рекомендована товщина зрізу становить 50 – 70 нм. На рис. 2.5 показаний загальний вигляд ультрамікротому та блок, зафіксований у тримачі для нарізки.<sup>11</sup>

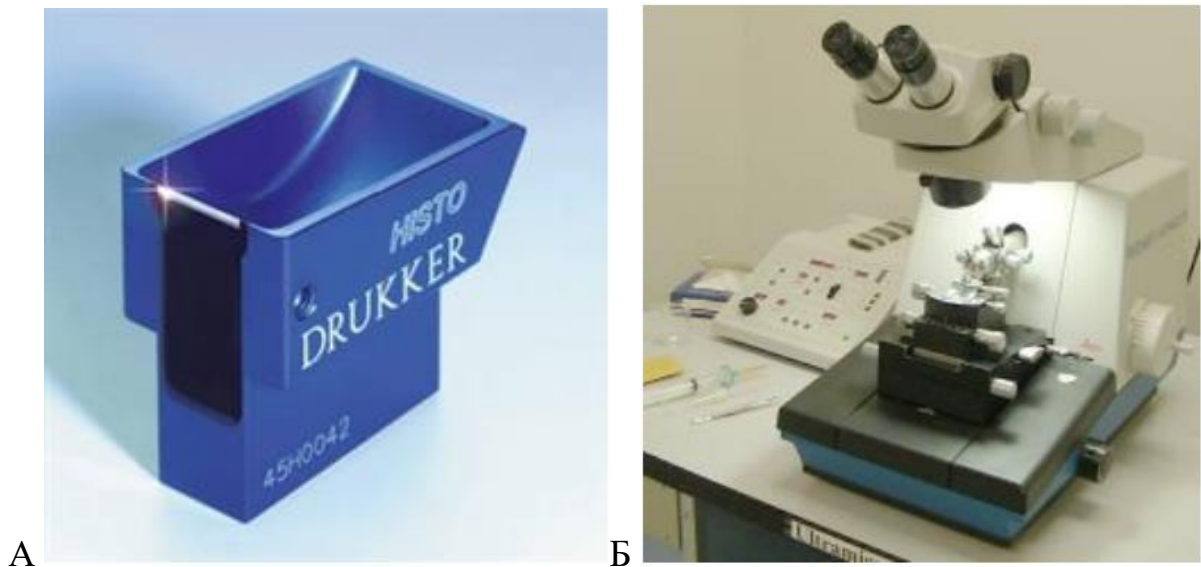


Рисунок 2.5 – Ультрамiкромом: загальний вигляд (А) та його частина (Б) – показано блок зi зразком у тримачi та нiж

#### 2.2.4.2 Контрастування ультратонких зрiзiв

Негативне контрастування препаратiв ультратонких зрiзiв рослинних тканин здiйснюють за допомогою унiверсального 2.5 % уранiацетата та додатково обробляють 0.02 Н цитратом свинця протягом 10 хв (тривалiсть залежить вiд товщини зрiзу, часу виготовлення контрастуючих розчинiв i визначається емпiрично). У даному випадку сумiсний вплив обох контрастерiв необхідний, оскiльки цитрат свинцю краще зв'язується з комплексами тканин та осмiєм.<sup>12</sup>

### 2.3 Статистична обробка результатiв

Для статистичної оцiнки значущостi отриманих результатiв застосовували метод бутстреп-аналiз (Bootstrap) з кiлькiстю реплiкацiй 100-1000. Також було використано можливостi програмного забезпечення Microsoft Excel та MEGA 6.0.3.

Статистична обробка результатів проводилася з врахуванням стандартного відхилення (формули 2.1, 2.2, 2.3).

$$E_d = E \pm A \quad (2.1)$$

де  $E_d$  – достовірне значення екстинкції;

$E$  – середнє арифметичне виміряних значень екстинкції;

$A$  – стандартне відхилення.

$$E = (E_1 + E_2 + \dots + E_i) / i \quad (2.2)$$

де  $E_1 \dots E_i$  – значення екстинкції;

$i$  – кількість експериментів.

$$A = |E_{\max} - E| = |E_{\min} - E| \quad (2.3)$$

де  $E_{\min}$  – мінімальне значення екстинкції;

$E_{\max}$  – максимальне значення екстинкції.

### РОЗДІЛ 3

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 3.1 Аналіз електронно-мікроскопічних зображень ультратонких зрізів тютюну, інфікованого ВТМ

При системній інфекції ВТМ детектується у всіх частинах рослини. Для світло-зелених або жовтих ділянок мозаїчних листків тютюну, системно інфікованого ВТМ, характерна гіпоплазія (пригнічення росту та/або диференціації) клітин палисадного мезофілу (рис.3.1).

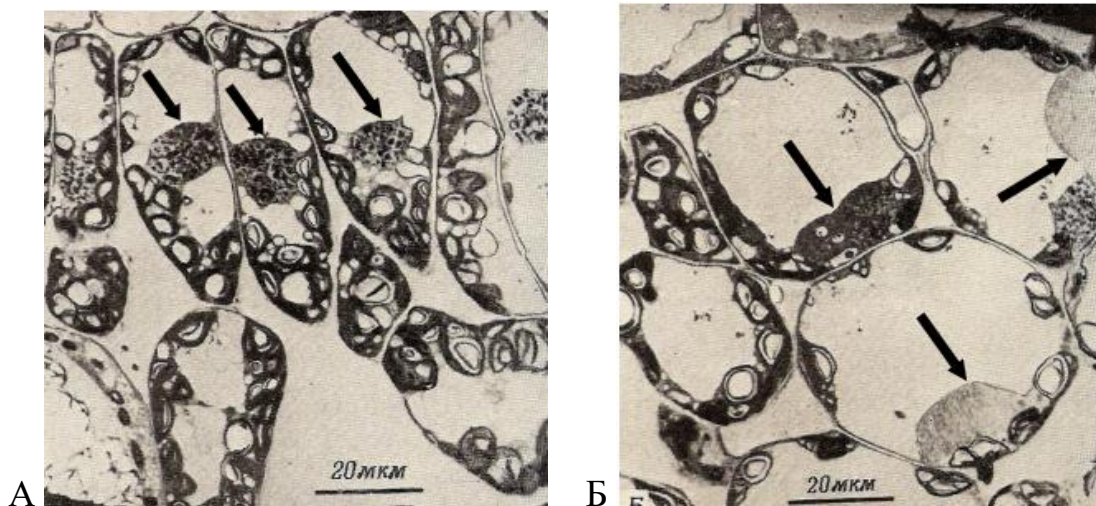


Рисунок 3.1 – Реакція клітин мезофілу листку тютюну на інокуляцію ВТМ: А – здорові палисадні клітини; Б – гіпоплазія палисадних клітин – клітини більші та недиференційовані за формою, ядро знаходиться не в центрі клітини (показано стрілками)

Товщина листку у таких зонах звичайно менша, клітини втрачають первинну морфологію, округлюються; міжклітинний простір між ними зменшується. Внаслідок реплікації вірусу такі клітини містять значно менше хлорофілу, що й зумовлює їх часткове знебарвлення. Менша кількість хлорофілу, в свою чергу, призводить до зниження ефективності фотосинтеза та, відповідно, синтезу вуглеводів. Зокрема, мозаїчні листки тютюну містять значно менше крохмалю.

Вірус реплікується у декількох типах клітин – мезофілі, епідермісі, корневих волосках та листкових волосках (трихомах). На клітинному рівні

віріони ВТМ були знайдені у цитоплазмі, ядрі та хлоропластах, причому в останніх були ідентифіковані в тому числі й псевдовірусні частки меншого розміру – РНК хлоропластів, упакованих в капсид ВТМ (рис.3.2, 3.3).



Рисунок 3.2 – Масиви часток ВТМ у цитоплазмі клітини тютюну при системній інфекції (V – вірус; W – клітинна стінка; N – ядро; M – мітохондрія; ER – ендоплазматичний ретикулум; D – апарат Гольджі) (x35000)

Тим не менше вважається, що основним сайтом синтезу та накопичення вірусних компонентів та дозрілих часток тобамовірусів є цитоплазма.

Для окремих видів тобамовірусів показана певна специфіка у локалізації клітинних сайтів репродукції вірусу та цитопатології. Зокрема, вірус зеленої крапчатої мозаїки огірку (ВЗКМО) індукує появу багатьох везикул та дегенерацію мітохондрій, що не є типовим для тобамовірусів.

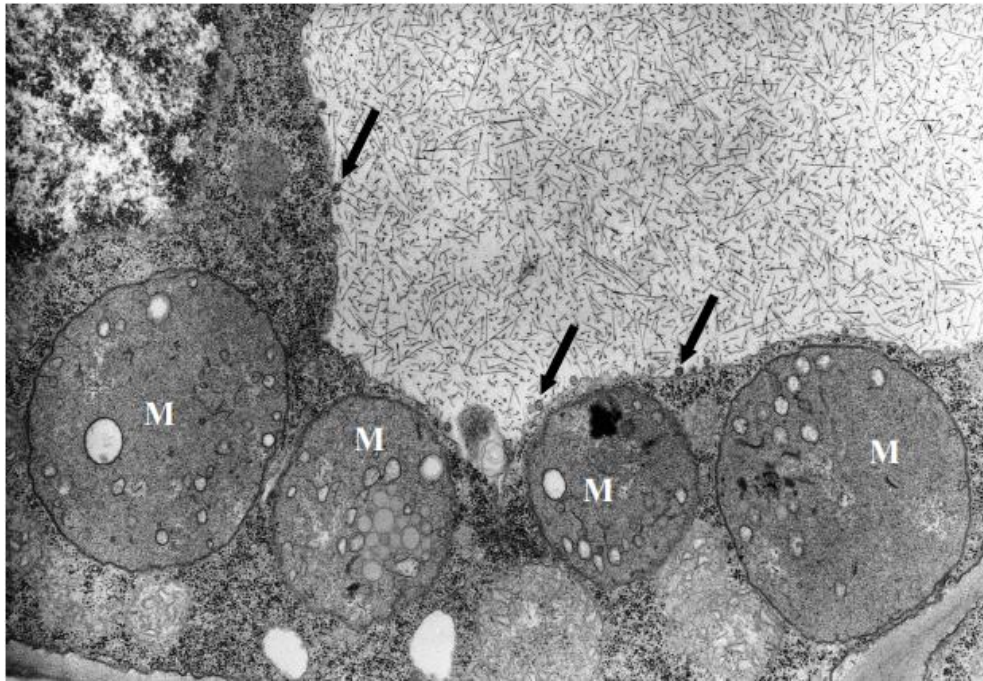


Рисунок 3.3 – Фрагмент хлоропласту клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Чітко помітні два сторонні включення вірусної природи (V). Структура хлоропласта в цілому не ушкоджена, на периферії з'являються перші везикули – вирости внутрішньої мембрани пластиди (x72000)

Узагальнюючи, можна сказати, що типовими симптомами на клітинному рівні є порівняно слабкий деструктивний вплив вірусу на нормальні клітинні структури. Спостерігається утворення появи численних везикул та мембранних утворів, відсутніх у здорових клітинах, поява везикул на тонопласті вакуолі (внаслідок чого іноді віріони детектуються у вакуолярному просторі). На пізніх етапах інфекції може мати місце деструкція хлоропластів та (рідко) збільшення у розмірах, вакуолізація та дегенерація мітохондрій (рис.3.4).

На початкових стадіях системної інфекції ВТМ у клітинах тютюну може спостерігатися укрупнення ядер та рихлість хроматину, що свідчить про високий рівень метаболізму клітин. Пізніше відбувається просвітлення нуклеоплазми та зменшення розміру ядерців.



Рисунок 3.4 – Фрагмент клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Показана пізня стадія інфекції. Помітна деструкція мітохондрій (М), утворення мембранних пухирців з внутрішнього боку тонопласта (показано стрілками) та накопичення часток ВТМ у вакуолі (x35000)

Найбільш типовим проявом цитопатичної дії ВТМ на клітини тютюну є утворення вірусоспецифічних включень, які можна спостерігати як в світловому (або люмінісцентному) мікроскопі, так і в електронному при аналізі ультратонких зрізів. Для ВТМ характерне утворення двох основних типів включень: кристалічних та аморфних.

Референтний штам ВТМ U1 звичайно індукує появу кристалічних включень, які найчастіше зустрічаються у клітинах трихом та листовому епідермісі. При розвитку мозаїчних симптомів під час захворювання такі включення діагностуються у клітинах світло-зелених або жовтих ділянок листків. Кристали набувають геометрично правильної форми і складаються з розташованих один над одним шарів паралельно розташованих віріонів ВТМ. На ультратонких зрізах клітин епідермісу тютюну такі включення виглядають як блоки упорядкованих вірусних часток, які розташовані під кутом один до

одного у виді «ялинки» (рис.3.5). Кристалічні включення ВТМ були ідентифіковані у більшості рослин родини *Solanaceae*, зокрема у тютюну.

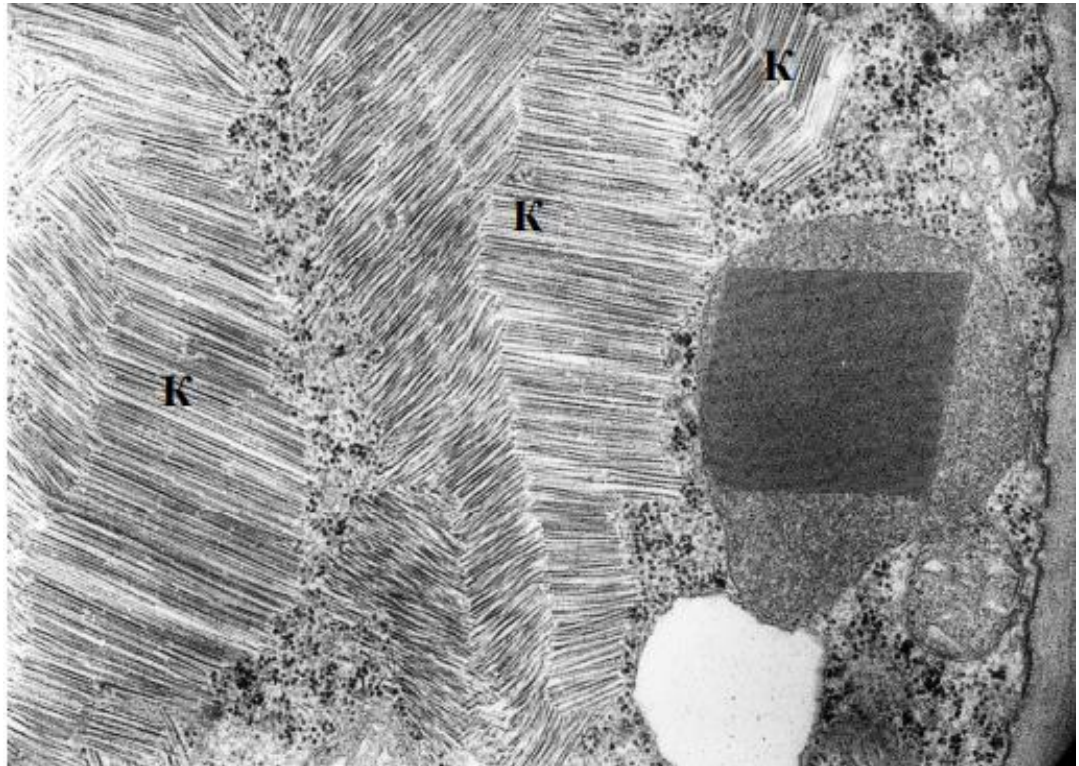


Рисунок 3.5 – Фрагмент клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Помітне кристалічне включення, яке займає практично весь об'єм клітини (пізня стадія інфекції)

Тим не менше необхідно відмітити, що утворення включень, хоча і є вірусоспецифічним процесом, однак значно залежить від клітинного метаболізму та стадії захворювання. Наприклад, для клітин тютюну показані також паракристалічні (рис.3.6), в тому числі веретеноподібні та волокнисті включення, які імовірно є продуктом перерозподілу вірусних часток з кристалічних включень. Детектувалися також голкоподібні та пластинчасті включення. Слід також сказати, що вид включень може залежати від штаму ВТМ.

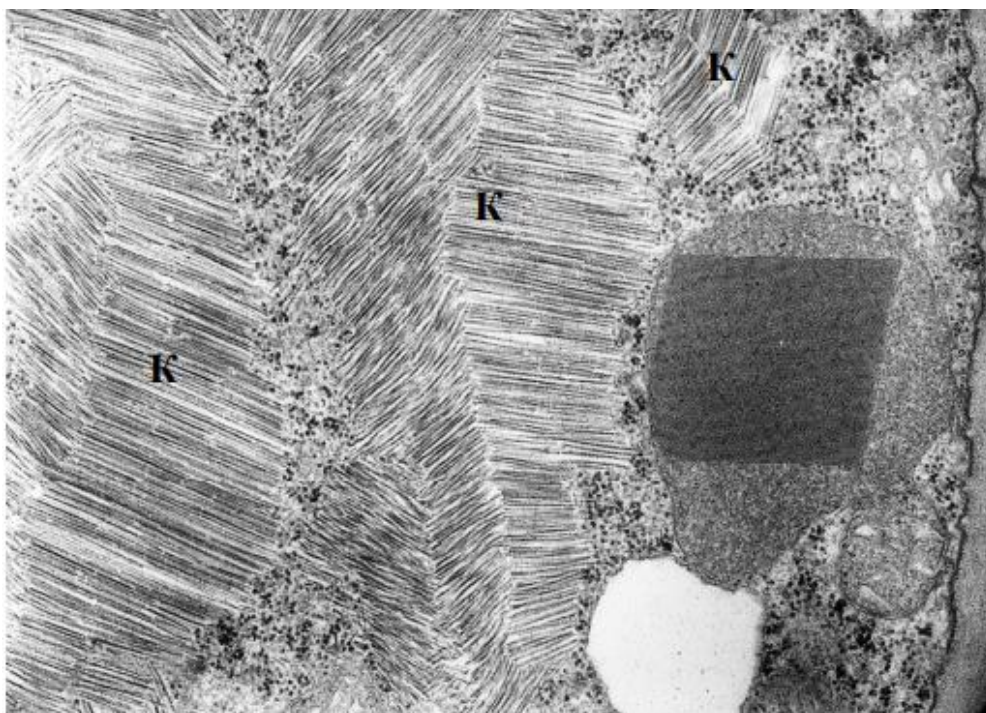


Рисунок 3.6 – Фрагмент клітини тютюну, інфікованої ВТМ. Помітні масиви кристалічних включень (К) (x60000)

Аморфні включення (Х-тіла) менш характерні для клітин тютюну, уражених ВТМ U1. Вони представлені некомпактними гранулами неправильної геометричної форми (рис.3.7). Ультрамiкроскопічні дослідження показали в аморфних включеннях можливу присутність рибосом, елементів ендоплазматичного ретикулуму, мікротрубочок, актинових філаментів та неідентифікованих мембранних структур.

Кристалічні та аморфні включення можуть збільшуватися у розмірах та змінювати локалізацію. Найчастіше включення, незалежно від їх типу, розташовані поблизу клітинної мембрани або інших мембранних структур – вакуолі, ядра, ендоплазматичного ретикулуму. Потрібно зазначити, що за своєю біохімічною природою обидва типи включень подібні і містять головним чином дозрілі вірусні частки ВТМ, за що їх назвали «фабриками віріонів» або віроплазмами. Включення ВТМ представляють собою місце акумуляції вірусу у клітині.

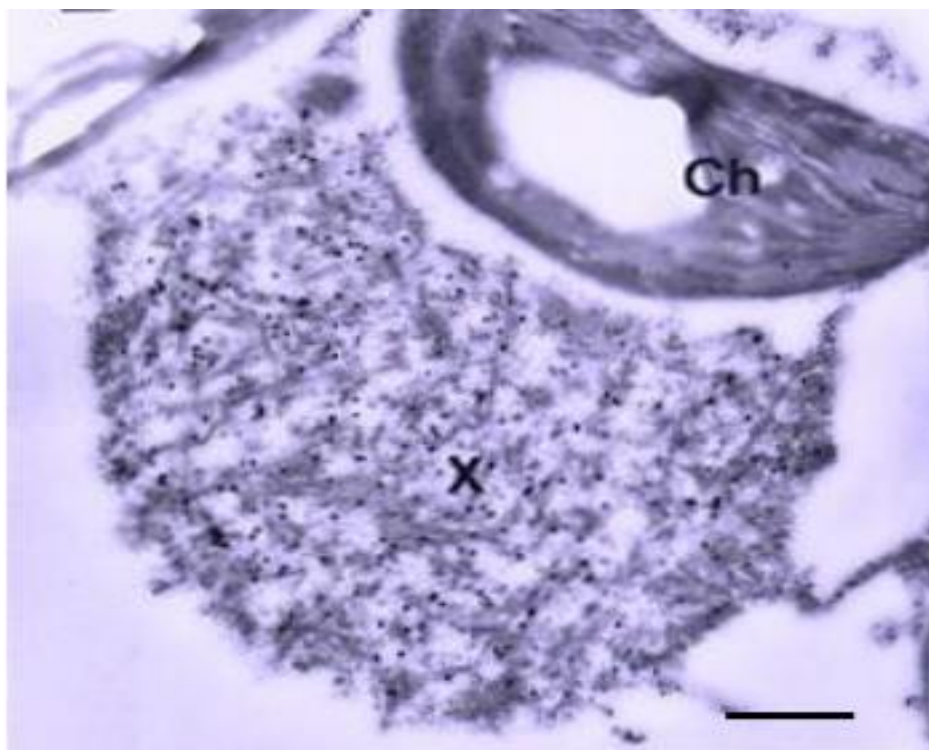


Рисунок 3.7 – Аморфне включення ВТМ (X-тіло) у клітині тютюну: помітна нещільність та присутність мембранних структур (X – X-тіло; Ch – хлоропласт; бар – 300 нм)

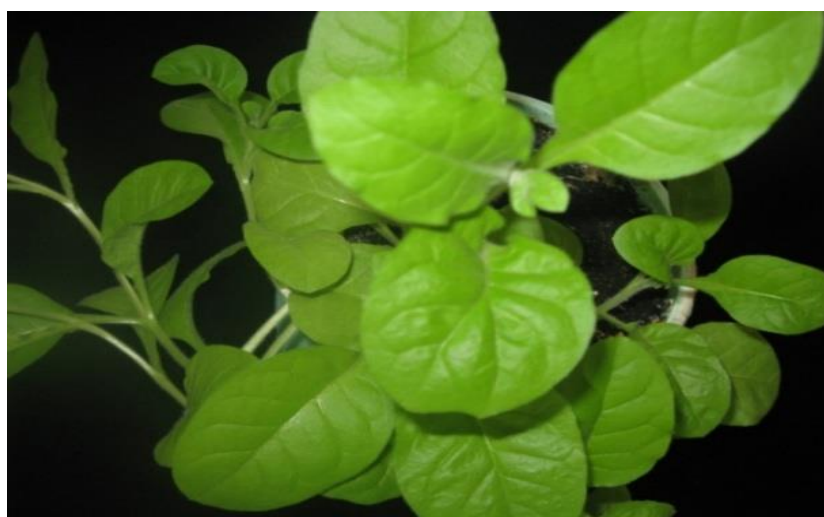
### 3.2 Біологічне тестування рослин-індикаторів

Віруси відрізняються за здатністю інфікувати різні рослини: кількість чутливих рослин варіює у різних вірусів. Вірусну інфекцію можна спостерігати на зовнішньому вигляді рослини, хоча це є відображенням внутрішньоклітинних змін, викликаних вірусів. Для дослідження біологічних властивостей вірусу тютюнової мозаїки був застосований метод біологічного тестування рослин-індикаторів (рис. 3.8). Як рослину індикатор використовували *Nicotiana tabacum*.

З часом, на рослинах-індикаторах спостерігали появу симптомів характерних для вірусу тютюнової мозаїки: мозаїку, некрози, хлорози на листовій пластинці. На контрольних рослинах симптоми не виявлялися.



А



Б

Рисунок 3.8 – Симптоми вірусної етіології на рослинах-індикаторах *Nicotiana tabacum*

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

Б – контрольна рослина *Nicotiana tabacum*.

Для подальшого дослідження рослин-індикаторів на наявність вірусних АГ використовували метод імуноферментного аналізу у модифікації “сендвіч”. Результати ІФА наведені в діаграмі (рис. 3.9).

Отримані результати досліджень підтвердили інфекційну природу вірусу тютюнової мозаїки. Біологічне тестування підтверджує інфекційну природу

виділеного ізоляту ВТМ оскільки уражені рослини-індикатори проявляли характерні симптоми вірусної етіології.

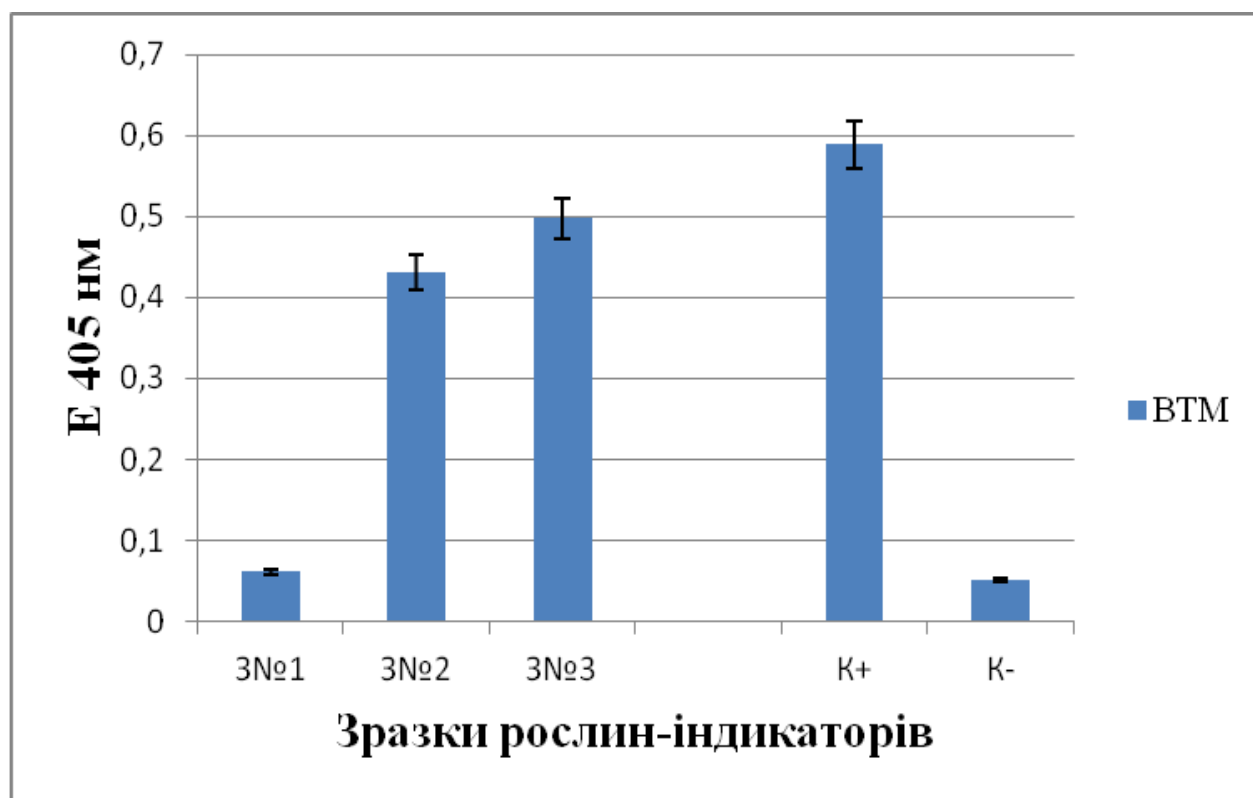


Рисунок 3.9– Результати виявлення антигену вірусу тютюнової мозаїки в рослинах-індикаторах за допомогою ІФА.

### 3.3 Профілактичний захист рослин від ВТМ

Вірус тютюнової мозаїки практично невиліковний. Одним із способів боротьби з ним – це 10 % розчин молока (1 дм<sup>3</sup> води на 100 см<sup>3</sup> молока). Цим розчином потрібно обприскувати розсаду тютюну, починаючи з появи першого дійсного листа, через кожні 10 днів. Він обволікає листки захисною плівкою. Добре в один дм<sup>3</sup> цього розчину додати 3 – 4 краплі йоду. Йод сприяє збільшенню кількості квіток на кисті.

Проти вірусних хвороб хімічних заходів захисту не існує. Захист рослин зводиться до профілактичних заходів:

1. Боротьба з комахами-переносниками (інсектициди, густота і строки посіву рослин).

2. Дотримання просторової ізоляції від минулорічних посадок тютюну не менше 0,5 м, сівозмін, кращих попередників, систем внесення добрив та обробітку ґрунту.

3. Вирощування оздоровленого насіннєвого і посадкового матеріалів:

- вибраковування уражених рослин у розсаднику;
- культура апікальних меристем – з недиференційованих тканин на штучних живильних середовищах вирощують рослину;
- прогрівання (при ураженні ендосперму) і протруювання насіння (20 %-й розчин HCl – 30 хв., 1 %-й розчин KMnO<sub>4</sub>);

4. Селекційний метод – створення стійких (у т.ч. й до пошкодження переносниками) і толерантних сортів.

5. Організаційно-господарські заходи – дезинфекція. Знезаражування інвентарю, який використовувався для пікірування і інших операцій.

6. Агротехнічні заходи.

- видалення мозаїчних рослин перед кожною культивацією до першого зламування листків;
- заборона куріння тютюну (особливо «потертості») на тютюнових посадках;
- проведення вибіркоким методом вершкування, пасинкування і виламування листків при великій кількості уражених рослин;
- висадження тютюну після неуражуючих попередників;
- Впровадження стійких сортів.
- знищення падалиці, рослинних решток, бур'яніврезерваторів інфекції, просторова ізоляція культур;

7. Сівозміни. Вірус зберігається в ґрунті, в мертвих рослинних тканинах і при відсутності сівозміни в наступному році уражує культуру з потрійною силою.

8. Вирощування, зокрема, на присадибних ділянках, стійких до хвороб сортів.

9. Листя збирають через 20 днів після останньої хімічної обробки. Восени, після збирання листя, слід провести подрібнення і заорювання стебел тютюну, що зменшить запас вірофорного трипсу і збудників хвороб в перспективі.

10. Система внесення добрив та обробка ґрунту.

Перед висаджуванням розсади у відкритий ґрунт, при високій чисельності ґрунтових шкідників та вірусів, корені розсади замочують в 0,2 % розчині інсектициду Актара 25 WG, в. г., експозиція – 90 – 120 хвилин; обробка плантацій через 8 – 10 днів після завершення посадки одним із інсектицидів: Бі–58 новий, к.е., 0,8–1 дм<sup>3</sup>/га, Золон, к.е., 1,6 – 2 дм<sup>3</sup>/га або Конфідор Максї 70 % в.г. з розрахунку 0,15 дм<sup>3</sup>/га. Для профілактики вірусної мозаїки своєчасне підчищення розсадних і 2 – 3 польових листків з подальшим своєчасним збиранням листя; при масовому заселенні рослин тютюну попелицею (понад 10 %) проводиться додатковий обробіток інсектицидом: Сумітїон, к.е., 1 – 1,4 дм<sup>3</sup>/га, Бі– 58 новий, к.е., 0,8 – 1 дм<sup>3</sup>/га, Золон, к.е., 1,6 – 2 /га, Конфідор Максї 70 % в.г., 0,15 дм<sup>3</sup>/га., але при наявності 6 – 7 ентомофагів на рослину, обробки недоцільні.

## ВИСНОВКИ

1. На рівні клітини вірусні інфекції рослин викликають як морфолого-функціональні зміни нормальних клітинних структур, так і появу нових вірусоспецифічних утворів – вірусних включень. Часто подібні індуковані цитопатичні зміни носять специфічний по відношенню до віруса характер і слугують допоміжним методом його діагностики.

2. Тютюнова мозаїка, збудник – *Tabacco mosaic virus* – проявляється у вигляді мозаїчності: чергуванні світло-зелених плям неправильної форми з нормально забарвленими ділянками. На молодих листках з'являється посвітління жилок і крапчастість, а на дорослих рослинах – некротичні плями.

Особливо чітко ознаки хвороби проявляються на верхівкових молодих листків вірус *Tabacco mosaic virus*, який уражує всі тканини у вигляді різкої мозаїчності. Крім цих ознак, при достатньому освітленні й високій вологості хвороба проявляється у вигляді папоротеподібності або ниткоподібності листків. На уражених плодах, хвороба проявляється у вигляді нерівномірності їх забарвлення під час досягання.

3. Передається він механічним шляхом. Основне джерело інфекції – уражені рештки і насіння. Джерелом інфекції є рослинні рештки, сухе листя, попелиці.

4. Біологічне тестування підтверджує інфекційну природу виділеного ізоляту ВТМ оскільки уражені рослини-індикатори проявляли характерні симптоми вірусної етіології.

5. Для дослідження рослин-індикаторів на наявність вірусних АГ використовували метод імуноферментного аналізу у модифікації «сендвіч».

Отримані результати досліджень підтвердили інфекційну природу вірусу тютюнової мозаїки.

6. Для дослідження біологічних властивостей вірусу тютюнової мозаїки був застосований метод біологічного тестування рослин-індикаторів.

7. Спостерігали появу симптомів характерних для вірусу тютюнової мозаїки: мозаїку, некрози, хлорози на листковій пластинці. Захист рослин зводиться до профілактичних заходів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- <sup>1</sup> Національна Академія Наук України. Нормативні акти НАН України. <http://www.nas.gov.ua/legaltexts/Pages/default.aspx> (дата звернення Груд 13, 2020)
- <sup>2</sup> Офіційний сайт Міжнародного Комітету з таксономії вірусів. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm> (дата звернення Груд 16, 2020).
- <sup>3</sup> Мфуті, П. Симптоми, передача та управління вірусом тютюнової мозаїки. *Farmer's Weekly*, **2017**, 17014, с 60 – 61.
- <sup>4</sup> Московець С.Н.; Бобирь А.Д.; Глушак Л.Е. *Вірусні хвороби сільськогосподарських культур*; Урожай, 2001; с 72 – 80.
- <sup>5</sup> Бойко А.Л. *Практикум із загальної вірусології*; Видавничий центр «Київський університет»: Київ, 2000; с 269.
- <sup>6</sup> Шольтоф, К. Б. Г. *Вірус тютюнової мозаїки: модель системи біології рослин*; Анну: 2004; с 13 – 34.
- <sup>7</sup> Скроцька, О.І.; Пирог, Т.П. ; Конспект лекцій на тему «Загальна вірусологія»; Київ: НУХТ 2011; с 140. <http://dspace.nuft.edu.ua/jspui/handle/123456789/754> (дата звернення Груд 20, 2020).
- <sup>8</sup> Вірус тютюнової мозаїки: характеристика, структура. <https://uk.warbletoncouncil.org/virus-del-mosaico-tabaco-5240> (дата звернення Груд 20, 2020).

- <sup>9</sup> Діагностика вірусів рослин, включаючи ТЕМ та аналіз вірусних включень.  
<http://plantpath.ifas.ufl.edu/pdc/Inclusionpage/Diag/What%20is%20it.html>  
(дата звернення Груд 21, 2020).
- <sup>10</sup> Київський Національний Університет імені Тараса Шевченка. Оптичні методи діагностики вірусних інфекцій рослин.  
[https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Virusol/Library/Optical\\_Techniques\\_for\\_Diagnostics\\_of\\_Plant\\_Viral\\_Infections.pdf](https://biology.univ.kiev.ua/images/stories/Kafedry/Virusol/Library/Optical_Techniques_for_Diagnostics_of_Plant_Viral_Infections.pdf) (дата звернення Груд 22, 2020).
- <sup>11</sup> Електронна мікроскопія цитопатології вірусних інфекцій рослин на моделі «тютюн – вірус тютюнової мозаїки».  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753373/> (дата звернення Груд 25, 2020).
- <sup>12</sup> Метод негативного контрастування у електронній мікроскопії вірусів.  
<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/negstain.html> (дата звернення Груд 27, 2020).