

УДК 578.863.1:578.74:57.083.13

## ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ КАРТОПЛІ В КУЛЬТУРАХ КЛІТИН ССАВЦІВ

Т. О. Бова, І. В. Волкова, Л. М. Решотько

Інститут сільськогосподарської мікробіології та агропромислового виробництва НААН  
вул. Шевченка, 97; Чернігів, 14027, Україна; e-mail: tanya\_bova@list.ru

*Наведено результати дослідження фізико-хімічних властивостей ізолятів вірусу скручування листя картоплі в культурах клітин СНЕВ та ВНК-21. Показано, що в культурах клітин ссавців ізоляти вірусу виявилися стійкими до ліпідорозчинників, до середовищ із значеннями рН від 4,0 до 10,0 та терморезистентними при 50 °С за відсутності двовалентних іонів магнію. Визначено точку температурної інактивації вірусу та оптимальну температуру для репродукції.*

Ключові слова: картопля, вірус скручування листя картоплі, культура клітин ссавців, фізико-хімічні властивості.

Вірус скручування листя картоплі (ВСЛК) належить до найбільш важливих в економічному відношенні фітопатогенних вірусів. Втрати врожаю, зумовлені інфекцією ВСЛК, залежно від сорту картоплі, кліматичних та ґрунтових умов становлять від 20 % до 90 % [1; 2]. ВСЛК розповсюджений у всіх країнах, де вирощують картоплю. Вірус скручування листя картоплі уражує широкий спектр рослин (сьогодні цей список об'єднує близько 40 видів), що належать до різних родин: *Amaranthaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Portulacaceae*, *Nolanaceae*, *Solanaceae*, але основним хазяїном вірусу є картопля [3; 4]. Сприйнятливими до ураження вірусом є також різні види сільськогосподарських культур: тютюн, томати, фізаліс та ін. Вірус скручування листя картоплі виявлено у бур'янистих та декоративних рослинах, які, завдяки своїй сприйнятливості, можуть бути резерватами цього вірусу в агроценозі.

Велика шкідливість ВСЛК пояснюється перш за все швидким розповсюдженням вірусу комахами-переносниками і передачею вегетативно потомству через бульби, які цілком або частково втрачають схожість.

В ареалі розповсюдження ВСЛК виділе-

но три зони шкідливості [5]. В зоні сильної шкідливості поширеність хвороби на картоплі становить більше 40 %, спостерігаються часті епіфітотії. В зоні середньої шкідливості епіфітотії виникають з інтервалом 8–10 років, а в зоні низької шкідливості розвиток хвороби не перевищує 10 %. Зона сильної шкідливості об'єднує країни Середньої Азії, Закавказзя, Казахстан, Північний Кавказ, західні регіони України. Середня шкідливість характерна для Білорусії, Молдови, Центрально-Черноземної зони, Приморського краю, країн Прибалтики, Сахаліну, Алтайського краю, областей Нижньогородська, Іванівська та Новгородська. На решті території вирощування картоплі розвиток хвороби не перевищує 10 %.

Але питання розповсюженості та шкідливості цього вірусу в різних кліматичних зонах України сьогодні залишається невизначеним. У 1989–1992 та 2008–2009 роках на базі Устимівської дослідної станції вивчали поширеність вірусних хвороб картоплі [6]. Показано, що важкі вірусні захворювання, описані раніше як готика, — це комплексні хвороби, зумовлені сумісною дією ВСЛК із вірусами мозаїчної групи. Таким чином, вірусне скручування листків є найбільш по-

ширеним і шкідливим захворюванням в умовах південної частини Лісостепу України.

Поширеність, ураженість сортів та гібридів картоплі ВСЛК вивчається в країнах Європи, Північної та Південної Америки, Африки, Азії, Австралії та Новій Зеландії. Існує точка зору про циклічність епіфітотій, спричинених ВСЛК, та їх зв'язок з сонячною активністю й посухами [7; 8].

ВСЛК має такі особливості, як надзвичайно низька концентрація в рослинних екстрактах, яка визначається локалізацією вірусу у флоемі, неможливість механічної передачі та дрібні розміри віріонів, що ускладнює дослідження ізолятів вірусу та діагностику хвороб, що ним викликаються.

Для вивчення властивостей ізолятів та штамів ВСЛК використовують рослини картоплі або рослини-індикатори, на які вірус переносять з інфікованих рослин щепленням або попелицями. Попелиць попередньо живлять на інфікованих рослинах чи через мембрани, або вводять препарат вірусу мікроін'єкціями [9]. Іноді для репродукції ВСЛК залучають протопласти мезофілу тютюну або картоплі та полі-L-орнітин, який утворює комплекс з вірусними частками і полегшує інфікування протопластів [10].

У 2009 році нами описано явище продуктивної інфекції вірусу скручування листя картоплі в культурах клітин ссавців [11; 12]. За результатами подальших досліджень запропоновано реакцію нейтралізації в культурі клітин для індикації та ідентифікації ВСЛК у рослинному матеріалі [13].

У зв'язку з цим метою нашої роботи було виділення ізолятів вірусу скручування листя картоплі в чисту культуру з вегетуючих рослин, бульб і попелиць та вивчити їх фізико-хімічні властивості.

**Матеріали і методи.** Для виділення ізолятів вірусу скручування листя картоплі обстежували розсадник первинного насінництва ЗАТ «Чернігівеліткартопля». Відібрали 18 зразків листя картоплі з симптомами ураження вірусом скручування листя картоплі та попелиці.

Виділення ізолятів ВСЛК проводили в культурах клітин перещеплюваної лінії нирки ембріона свині (СНЕВ) та перещеплюваної лінії нирки новонародженого хом'яка (ВНК-21), яку вирощували в пробірках. Перед внесенням вірусу видаляли з пробірок

живильне середовище, моношар дворазово відмивали 0,15 М NaCl або розчином Хенкса. Вносили освітлені хлороформом досліджувані зразки по 0,1 см<sup>3</sup> та витримували в термостаті за температури 37 °С для контакту упродовж 1 години. Після цього моношар відмивали розчином Хенкса і заливали підтримуюче середовище. Інокульовані пробірки з культурою клітин інкубували в термостаті за температури 37 °С до появи ознак цитопатичної дії (ЦПД) вірусу. Проводили 3–5 сліпих пасажів у культурах клітин [11].

Терморезистентність вірусів вивчали шляхом прогрівання проб на водяній бані упродовж 1 години за температури 50 °С та присутності 1 М MgCl<sub>2</sub> і без нього. Проби вірусу непрогрітого, прогрітого в присутності іонів магнію і без них титрували [14].

Стабільність вірусів за різних значень рН середовища вивчали в культурі клітин СНЕВ. Для цього віруси витримували в середовищі із значенням рН 2,0; 3,0; 4,0; 7,2; 10,0; 11,0 за кімнатної температури упродовж 10 хвилин. Після цього у всіх пробах доводили рН до значення 7,2. Чутливість вірусу до кислого і лужного значень рН визначали за різницею титрів вірусів порівняно з контролем [14].

Вплив температури на функціонування системи ВСЛК – тваринна клітина вивчали в культурі клітин ВНК-21. Моношар культури клітин інокульовали штамом Седнівський вірусу скручування листя картоплі в дозі 1 ТЦД<sub>50</sub>. Інкубацію проводили при 2, 10, 24 та 37 °С. Відмічали дегенеративні зміни моношару, час їх появи та інфекційну активність вірусу [11].

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведених вірусологічних досліджень із 18 зразків матеріалів у 3–5-му пасажах в культурі клітин СНЕВ виділено 4 ізоляти вірусів. Після інокуляції культури клітин інфекційними зразками через 48 год. спостерігали цитопатичну дію вірусу. Дегенеративні зміни культури клітин СНЕВ виявлялися появою поодиноких округлих клітин з підвищеною рефрактерністю, з поступовим зростанням їх кількості. Уражені клітини збільшувалися у розмірах, втрачали зв'язок з оточуючими клітинами і відділялися від скла. В моношарі з'являлися ділянки без них, які збільшувалися у розмірах до повного руйнування осередків клітин (рис. 1).

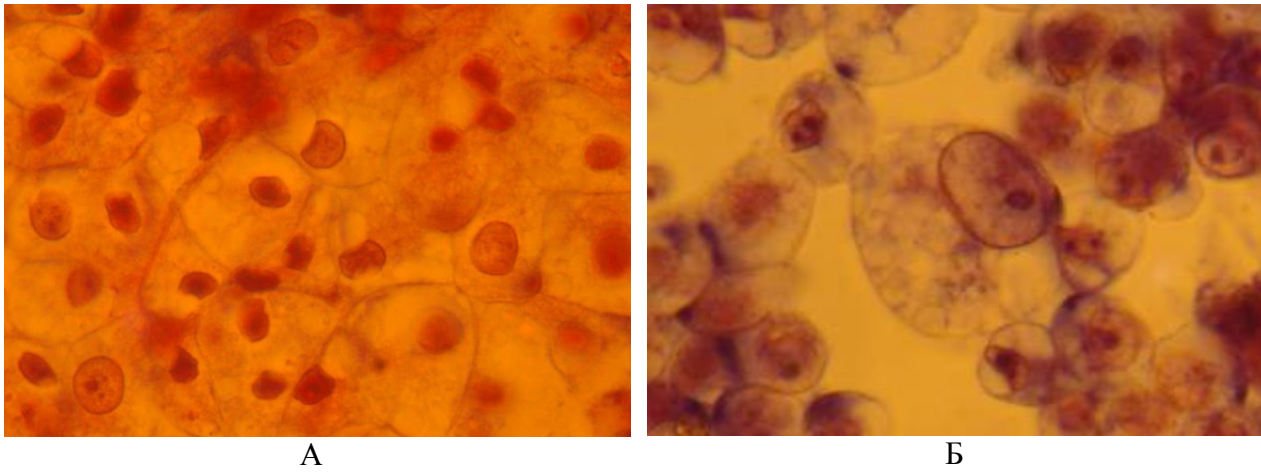


Рис. 1. Культура клітин СНЕВ, інокульована ізолятом ВСЛК, виділеного з попелиць (Б), та без інокуляції (А) ( $\times 640$ ). Забарвлення метиленовим синім та фуксином лужним.

Ізоляти вірусів з досліджених зразків виділялись у 3–5 пасажах, їх інфекційні титри становили  $4,0\text{--}7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (табл. 1).

Відомо, що певні фізико-хімічні властивості вірусів у культурах клітин є генетичними маркерами, які дозволяють віднести вірусні ізоляти до певних таксономічних груп. Так, тешовіруси стабільні в широкому діапазоні рН від 2,0 до 11,0, термостабільні при  $50^\circ\text{C}$  в присутності іонів магнію, резистентні до обробки ліпідорозчинниками [14]. Зважаючи на те, що генетичних маркерів для ВСЛК в культурах клітин ссавців не встановлено, проводили аналіз стійкості ізолятів вірусів до ліпідорозчинників, вивчали чутливість до середовищ з різними значеннями рН та термостабільність.

Стійкість вірусів до середовищ з різними значеннями рН визначали при показниках 2,0; 3,0; 4,0; 7,2; 10,0 та 11,0. Як видно з ре-

зультатів, наведених у табл. 2, інфекційний титр вірусів майже не змінювався в інтервалі рН від 4 до 10,0, знижувався на  $4 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  при рН 3,0, а при рН 2,0 спостерігалася повна інактивація вірусів.

Ізоляти вірусів, виділені з рослинних зразків та попелиць, виявилися стійкими до ліпідорозчинників (ефір, хлороформ), що свідчило про відсутність ліпидовмісної оболонки.

При вивченні термостабільності виділених ізолятів ВСЛК встановлено, що точка температурної інактивації (ТТІ) вірусів у культурі клітин СНЕВ після прогрівання їх упродовж 10 хвилин знаходиться в межах від  $60^\circ\text{C}$  до  $65^\circ\text{C}$ . За даними Murayama, Kojima [15] ТТІ ВСЛК при нагріванні соку впродовж 10 хвилин знаходиться в межах від  $70^\circ\text{C}$  до  $80^\circ\text{C}$ . Для визначення ТТІ дослідники використовували для зараження рослин-

Таблиця 1. Ізоляти ВСЛК, виділені з рослинних зразків та попелиць

№№ ізолятів	Джерело виділення ізоляту	Симптоми ураження рослин	Пасаж виділення	Інфекційна активність ізолятів ( $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ )
1	Листя картоплі сорту Невська	пожовтіння верхівкового листя, червонуватий колір по краях	4	7,5
3	Листя картоплі сорту Тирас	карликовість, вертикальний габітус, скручування листя нижнього ярусу	3	4,5
9	Попелиці з листя картоплі сорту Тирас	пожовтіння верхівкового листя, червонуватий колір по краях	4	6,0
14	Попелиці з листя картоплі сорту Сувенір Чернігівський	легка мозаїка листя	5	4,0

Таблиця 2. Вплив значення рН середовища на інфекційну активність вірусів

Ізоляти вірусів	Титр вірусу (lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )*					
	рН 7,2	рН 2,0	рН 3,0	рН 4,0	рН 10,0	рН 11,0
1	8,5	0	4,0	8,0	8,0	6,0
3	8,5	0	4,5	8,5	8,0	5,5
9	8,0	0	4,0	8,0	7,0	6,0
14	8,5	0	3,5	7,5	7,5	5,5

\*Примітка: похибка досліджень становить 0,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

індикаторів попелиць, які інфікувалися соком рослин за допомогою ін'єкцій. На нашу думку, розбіжність у значеннях ТПі обумовлена різним хімічним складом середовищ, в яких знаходилися віруси при прогріванні.

Терморезистентність вивчали шляхом визначення інфекційної активності вірусів у культурі клітин після прогрівання їх при 50 °С упродовж 1 години в присутності 1 М розчину MgCl<sub>2</sub> та без нього згідно з методикою Wallis C., Melnick J. [14]. Інфекційна активність ізолятів вірусу при прогріванні без 1 М розчину MgCl<sub>2</sub> не змінювалася в порівнянні з непрогрітим контрольним зразком, а в присутності 1 М розчину MgCl<sub>2</sub> зменшувалася на 2–3,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, що свідчить про відсутність стабілізації віріонів двовалентними катіонами магнію (табл. 3).

Отже, при дослідженні фізико-хімічних властивостей ізолятів ВСЛК у культурі клітин СНЕВ встановлено, що досліджувані віруси виявилися стійкими до ліпідорозчинників, до середовищ із значеннями рН від 4,0 до 10,0 та терморезистентними при 50 °С за відсутності двовалентних іонів магнію.

При дослідженні впливу температури інкубації вірусу в культурі клітин ВНК-21 відмічено значне уповільнення репродукції ВСЛК за температур, менших за +24 °С (табл. 4). Так, при 2 та 10 °С після 7 діб інкубації дегенеративних змін моношару культури не спостерігали. Інфекційний титр ВСЛК знижувався до 2 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. При 24 °С на 3-тю та 4-ту добу після інокуляції спостерігали поодинокі округлі клітини. Через 7 діб спостерігали руйнування 75 % моношару.

Таблиця 3. Терморезистентність ізолятів ВСЛК у культурах клітин СНЕВ

Ізоляти вірусів	Титр вірусу (lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )*		
	Контроль (без прогрівання)	Прогрівання при 50 °С, 1 год.	Прогрівання при 50 °С, 1 год, 1 М розчин MgCl <sub>2</sub>
1	8,5	8,5	5,0
3	8,0	8,0	5,0
9	6,5	6,5	4,0
14	6,5	6,0	4,0

\*Примітка: похибка досліджень становить 0,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Таблиця 4. Вплив температури на репродукцію ВСЛК в культурі клітин ВНК-21

Температура інкубації, °С	Дегенеративні зміни моношару культури клітин	Термін спостереження, дні	Інфекційний титр вірусу (lg ТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )
2	не спостерігали	7	2,0
10	не спостерігали	7	2,0
24	поодинокі округлі клітини	3	4,5
24	поодинокі округлі клітини	4	5,5
24	руйнування 75 % моношару	7	6,5
37	руйнування 75 % моношару	1	7,5

Інфекційна активність при цьому на 3-тю та 4-ту добу становила 4,5–5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> відповідно, на 7-му добу — 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>. За оптимальної температури інкубації (37 °С) цитопатична дія вірусу розвивалася через 24 години, інфекційний титр вірусу дорівнював 7,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Таким чином, у культурах клітин ссавців виділено 4 ізоляти вірусу скручування листя картоплі, які виявилися стійкими до ліпідорозчинників, до середовищ зі значеннями рН від 4,0 до 10,0 та терморезистентними при 50 °С за відсутності двовалентних іонів магнію, ТТІ знаходиться в межах 60–65 °С. Оптимальною температурою для репродукції ВСЛК є +24 °С та вище.

1. Анисимов Б. В. Фитопатогенные вирусы и их контроль в семеноводстве картофеля / Анисимов Б. В. — М. : ФГНУ «Роинформагротех», 2004. — 80 с.

2. Власов Ю. И. Сельскохозяйственная вирусология / Ю. И. Власов, Э. И. Ларина. — М. : Колос, 1982. — 237 с.

3. Гнутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии / Р. В. Гнутова. — М. : Наука, 1985. — С. 147–153.

4. Мельничук М. Д. Фітовірусологія : навч. посібник / М. Д. Мельничук. — К. : Поліграф Консалтинг, 2005. — 200 с.

5. Цыпленков А. Е. Ареал и зоны вредоносности вируса скручивания листьев картофеля (ВСЛК) [электронный ресурс] / А. Е. Цыпленков, М. И. Саулич // Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения [Интернет-версия 2.0] / Афонин А. Н., Грин С. Л., Дзюбенко Н. И., Фролов А. Н. (ред.). — 2008. — Режим доступа : [www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Solani/Solani\\_Potato\\_leafroll\\_luteovirus/map](http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Solani/Solani_Potato_leafroll_luteovirus/map).

6. Чигрин А. В. До питання про готику та вірусне скручування листків картоплі / Чигрин А. В. // Вісник Полтавської державної ака-

демії. — 2004. — № 4. — С. 64–70.

7. Bagnall R. H. Epidemics of potato leaf roll in North America and Europe linked to drought and sunspot cycles / R. H. Bagnall // Canadian journal of plant pathology. — 1988. — Vol. 10, № 3. — P. 193–202.

8. Thomas J. E. First report of twenty-two new hosts of potato leafroll virus / Thomas, JE, Hassan, S. // Plant disease. — 2002. — Vol. 86, № 5. — P. 561.

9. Harrison B. D. Potato leafroll virus [електронний ресурс] / Harrison B. D. // Home page of Description of plant viruses / Scottish Crop Research Institute. — Invergowrie. — Режим доступу : <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=291>. — Заголовок з екрану.

10. Barker H. Infection of potato mesophyll protoplasts with Five Plant Viruses / H. Barker, B. D. Harrison // Plant cell reports. — 1982. — № 1. — P. 247–249.

11. Пат. 97981 Україна. Спосіб культивування вірусу скручування листя картоплі в перещеплюваних лініях культур клітин ссавців / Волкова І. В., Бова Т. О., Дерев'янка С. В., Зарицький М. М. ; заявник і патентовласник ІСГМ НААН. — № а200912162, заявл. 26.11.2009 ; опубл. 10.04.2012, бюл. № 7.

12. Чутливість культур клітин тварин до вірусу скручування листя картоплі / [Т. О. Бова, І. В. Волкова, Н. В. Несетрова та ін.] // XIII з'їзд товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського (Ялта, 1–6 жовтня 2013 р.) : тези доповідей. — Ялта, 2013. — С. 4418.

13. Волкова І. В. Діагностика вірусу скручування листя картоплі за використання культури клітин ссавців / Волкова І. В., Бова Т. О. // Захист і карантин рослин : міжвід. темат. наук. зб. — К. : Білоцерківдрук, 2012. — Вип. 57. — С. 63–68.

14. Wallis C. Magnesium chloride enhancement of cell susceptibility to poliovirus / Wallis C., Melnick J. L. // Virology. — 1962. — № 16. — P. 122–132.

15. Murayama D. Studies on the properties of potato leaf roll virus by the aphid-injection method / Murayama D., Kojima M. // Ann. phytopathol. soc. Japn. — 1965. — № 30. — P. 209–215.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Т. А. Бова, И. В. Волкова, Л. М. Решотко**

Институт сельскохозяйственной микробиологии и агропромышленного производства НААН, г. Чернигов

*Приведены результаты исследования физико-химических свойств изолятов вируса скручивания листьев картофеля в культурах клеток СПЭВ и ВНК-21. Показано, что в культурах клеток млекопитающих изоляты вируса оказались устойчивыми к липидоразтворителям, средам со значениями pH от 4,0 до 10,0 и терморезистентными при 50 °С при отсутствии двухвалентных ионов магния. Определена точка температурной инактивации вируса и оптимальная температура для репродукции.*

Ключевые слова: картофель, вирус скручивания листьев картофеля, культура клеток млекопитающих, физико-химические свойства.

## INVESTIGATION OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF POTATO LEAFROLL VIRUS ISOLATES IN CULTURES OF MAMMALIAN CELLS

**T. O. Bova, I. V. Volkova, L. M. Reshotko**

Institute of Agricultural Microbiology and Agroindustrial Manufacture, NAAS, Chernihiv

*The paper presents the research data of physical and chemical properties of potato leaf rolling virus isolates in the PEKV and BHK-21 cell cultures. It was shown that in mammalian cell cultures the isolates of potatoes leaf rolling virus were resistant to the action of lipid dissolving agents, cultural media with pH from 4.0 to 10.0 and were thermoresistant at 50 °C in the absence of divalent ions of magnesium. The virus inactivation temperature point along with the optimum temperature for its reproduction were established.*

Key words: potato, potato leafroll virus, mammalian cells culture, physico-chemical properties.