

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

КОМПАНЕЦЬ ТАРАС АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК [578.85/.86+57.085.2]:632.9

**ВІРУСНІ ХВОРОБИ ГЕРБЕРИ (*GERBERA JAMESONII* BOLUS EX HOOK) ТА
БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРИЙОМИ ОТРИМАННЯ ЇЇ БЕЗВІРУСНОГО ПОСАДКОВОГО
МАТЕРІАЛУ**

03.00.06 – вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2002

Дисертація є рукописом.

Робота виконана на кафедрі вірусології біологічного факультету
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник: доктор біологічних наук, академік УААН та ВШ,
професор **Бойко Анатолій Леонідович**, Київський національний
університет імені Тараса Шевченка, завідувач кафедри вірусології

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Щербатенко Іван Степанович, Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного НАНУ, завідувач відділу фітопатогенних вірусів

кандидат біологічних наук, доцент **Мельничук Максим Дмитрович**,
Національний аграрний університет, завідувач кафедри фізіології рослин,
вірусології та біотехнології

Провідна установа: Інститут сільськогосподарської
мікробіології УААН, м. Чернігів

Захист дисертації відбудеться 17 грудня 2002 року о 14 годині на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.14 Київського національного
університету імені Тараса Шевченка за адресою:
03127, м.Київ, проспект Глушкова, 2, корп. 12, біологічний факультет.

Поштова адреса: 01033, м.Київ, вул. Володимирська, 64.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Київського
національного університету імені Тараса Шевченка:
01033, м.Київ, вул. Володимирська, 58.

Автореферат розісланий 6 листопада 2002 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Молчанець О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рівень виробництва в промисловому квітникарстві є відбитком культурних та естетичних потреб суспільства та ступеня його індустріального розвитку. Попит на живі квіти в наш час значно випереджає пропозиції виробництва і задовольнити його можна було б за рахунок інтенсивніших технологій. Проте підвищення ефективності та якості продукції декоративного квітникарства на теперішньому етапі його розвитку може бути досягнутим лише шляхом вирішення проблеми отримання здорового посадкового матеріалу. Адже в умовах сучасного інтенсивного промислового квітникарства одним з факторів, що обмежує продуктивність та розвиток декоративно-квіткових культур, є фітовірусні інфекції, які викликають погіршення декоративних якостей та фізіологічного стану рослин, що в кінцевому рахунку призводить до значних економічних збитків, а саме – зниженню врожаю на 40-70% (Митрофанова, 2001). З огляду на те, що переважна більшість промислових квітникарських господарств України вирощують свою продукцію в умовах захищеного ґрунту, постає проблема розповсюдження та накопичення інфекцій. Проблема ураження фітовірусами особливо актуальною є для багаторічних рослин, які розмножуються вегетативно, оскільки при цьому збудник, як правило, передається новій рослині. І чим інтенсивнішим буде вегетативне розмноження культури, тим більше відбуватиметься розповсюдження вірусу. До економічно вигідних культур, що в умовах захищеного ґрунту розмножуються вегетативно, а звільнення від вірусів є особливо доцільним, належать і гібридні форми Гербери Джеймсона (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook).

Гербера Джеймсона – багаторічна трав'яниста рослина, родини Айстрових, з ремонтантним цвітінням впродовж усього року. Її суцвіття - кошики - вирізняються декоративністю та великим різноманіттям форм і забарвлення. У промисловому квітникарстві України гербера є порівняно новою, але перспективною культурою. А останні п'ять-шість років цією культурою, окрім великих квітково-декоративних господарств, зацікавилися квітникарі-аматори (Чумак та ін., 2001). В результаті успішної селекційної роботи, особливо в останні десятиріччя, отримано нові високодекоративні сорти гербери. Неабияке економічне значення за комерційного вирощування цієї культури є те, що вона добре зберігається в зрізаному вигляді.

Більшість методів захисту рослин від фітопатогенних вірусів виявляють опосередковану дію й орієнтовані на скорочення резервуарів інфекції, зменшення розповсюдження вірусів переносниками та зменшення шкодочинного впливу вірусу на рослину через підвищення стійкості рослин до цих патогенів, виведення вірусостійких сортів, а також отримання посадкового матеріалу на безвірусній основі. У зв'язку з внутрішньоклітинним паразитизмом вірусів, найбільш ефективними є біотехнологічні прийоми звільнення рослин від цих патогенів з подальшим культивуванням у захищених від повторного інфікування умовах. Для цього застосовується метод культури тканин *in vitro*, що лежить в основі клонального мікророзмноження рослин, а також відкриває широкі можливості для боротьби з фітовірусними інфекціями. Однією з найважливіших умов отримання безвірусного посадкового матеріалу є наявність надійних методів тестування рослин. Отже, тільки поєднання зусиль таких наук, як вірусологія та біотехнологія, може перешкодити розповсюдженню та накопиченню вірусних хвороб на декоративно-квіткових культурах захищеного ґрунту.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася в межах науково-дослідної роботи кафедри вірусології біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка за темами: „Дослідити закономірності патогенезу фітовірусних інфекцій з метою раціонального використання природних ресурсів”, держбюджетна тема 97089 (номер державної реєстрації 0197U003157) та „Моніторинг збудників вірусних інфекцій з метою розробки наукових основ екологічно чистих технологій вирощування сільськогосподарських культур”, держбюджетна тема 01БФ036-01 (номер державної реєстрації 0101U005076).

Мета і завдання дослідження У зв'язку з економічною перспективністю культури гербери метою досліджень було обстеження її промислових насаджень, виявлення та ідентифікація збудників

вірусних хвороб і розробка можливих шляхів отримання безвірусного посадкового матеріалу цієї культури.

Для досягнення зазначеної мети необхідно було вирішити такі завдання:

Провести обстеження промислових насаджень гербери на наявність вірусної інфекції.

Ідентифікувати збудників виявлених вірусних захворювань.

Вивчити морфолого-біологічні властивості збудників виявлених вірусних захворювань.

Відпрацювати основні етапи технологічного процесу отримання здорового посадкового матеріалу гербери.

Розробити біологічну технологію отримання безвірусних рослин та їх промислового вирощування.

Об'єктом дослідження були рослини *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook, які знаходяться в промисловому вирощуванні у закритому ґрунті в державній агрофірмі „Квіти України” (м. Київ), ВАТ „Агрофірма Троянда” (м. Київ), СТОВ „Теремки” (м. Київ) та рослини селекційного комплексу гербери в Нікітському ботанічному саду Національного наукового центру УААН (м. Ялта).

Предметом дослідження були вірусні хвороби гербери, їх збудники та технологія отримання здорового посадкового матеріалу.

Методи дослідження. Для виявлення та ідентифікації вірусів застосовували непрямий метод імуноферментного аналізу та трансмісивну електронну мікроскопію. Виділення і очищення вірусу проводили методом диференційного центрифугування. Капсидний білок виділеного вірусу досліджували методом електрофорезу в ПААГ. За допомогою біотехнологічних методів здійснювали введення гербери в культуру, культивування, клональне мікророзмноження та вкорінення *in vitro*, адаптацію регенерантів *in vivo*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше в Україні проведено обстеження промислових насаджень гербери на вірусоносійство. Досліджено властивості збудників інфекційних вірусних хвороб гербери. Виявлено не описаний раніше на рослинах гербери вірус, який за серологічними властивостями та морфологією віріона належить до родини *Potyviridae*. Результати досліджень можуть бути використані для контролю фітосанітарного стану промислових насаджень гербери та вірусологічного контролю на різних етапах клонального мікророзмноження рослин.

Практичне значення роботи. Розроблено біологічну технологію отримання і вирощування безвірусних рослин гербери. Визначено оптимальні умови отримання асептичної культури гербери *in vitro*. Створено нові модифікації живильного середовища для культивування, мікроклонального розмноження та укорінення рослин гербери. На сортах „Роулетта” та „Циган” відпрацьовано технологію отримання безвірусного посадкового матеріалу гербери. Розроблену технологічну схему отримання здорового посадкового матеріалу впроваджено у виробництво. Результати досліджень запроваджено у навчальний процес на кафедрі вірусології Київського національного університету імені Тараса Шевченка і використано при написанні навчального посібника.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійною роботою автора. Інформаційний пошук, опрацювання літературних джерел, розробка схеми експерименту, отримання експериментальних даних, їх узагальнення та інтерпретацію автором дисертації здійснено особисто. Підготовку публікацій за отриманими результатами, а також представлення результатів на наукових конференціях здійснено за участю наукового керівника. Частина досліджень проведено за сприяння співробітників кафедри вірусології біологічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка, які є співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень, які викладено в дисертаційній роботі, були представлені на:

Міжнародній конференції „Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі”, Львів, Україна, 1998 рік;

II Міжнародній конференції „Біоресурси та віруси”, Київ, Україна, 1998 рік;

III Міжнародній конференції „Біоресурси та віруси”, Київ, Україна, 2001 рік;

Міжнародній конференції „Micropropagation of ornamental plants”, Каунас, Литва, 2001 рік;

Міжнародному симпозиумі „Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources”, Ялта, Україна, 2002 рік.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 робіт, з них 5 статей у наукових виданнях, 4 - матеріали конференцій та навчальний посібник у співавторстві. Права співавторів не порушено.

Структура і обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 142 сторінках машинописного тексту і містить: вступ, огляд літератури, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень (3 розділи), узагальнення, висновки, список використаних джерел та додатки. Список літератури включає 168 найменувань, з них 95 - іноземні.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. На основі робіт вітчизняних і зарубіжних авторів висвітлено сучасні відомості про біологічні властивості гербери та різноманітні її патології, що виникають внаслідок дисбалансу мінерального живлення, а також впливу бактеріальних і грибних патогенів та шкідників.

Структуровано відомості про ураження гербери вірусами, дана їх характеристика. Наведено теоретичні основи і принципи отримання здорового посадкового матеріалу рослин.

Матеріали та методи досліджень. У роботі використовувались рослини гербери, що знаходилися у промисловому вирощуванні в державній агрофірмі „Квіти України” (м. Київ), ВАТ „Агрофірма Троянда” (м. Київ), СТОВ „Теремки” (м. Київ) та рослини селекційного комплексу гербери в Нікітському ботанічному саду Національного наукового центру УААН (м. Ялта). Для проведення досліджень відбирали рослини гербери з такими симптомами: мозаїчність, некротизація, деформація листкових пластинок, жовтяниця, хлороз, затримка розвитку та різноманітні патології генеративних органів. Для подальшого дослідження з інфікованих рослин використовували надземну частину, переважно листки та суцвіття.

Виявлення вірусних антигенів в уражених рослинах проводили за допомогою модифікованого непрямого методу імуноферментного аналізу (ІФА) (Гнутова, 1993), з сироватками до таких вірусів: тютюнової мозаїки (ВТМ); плямистого зів'янення томатів (ВПЗП); скручування листків картоплі (ВСКЛ); Х картоплі (ХВК); F картоплі (FBK); S картоплі (SBK); Y картоплі (YBK); мозаїки буряка (ВМБ); жовтяниці буряка (ВЖБ).

Електронномікроскопічний аналіз зразків проводили за загальноприйнятими методиками (Миронов, 1994; Салига та ін., 1999).

Виділення та очищення вірусу проводили методом диференційного центрифугування. Чистоту виділеного вірусного препарату визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-26.

Електрофорез білків в поліакриламідному гелі проводили за Лемлі (Laemmli, 1970).

Для встановлення біологічних особливостей виділеного вірусу використовували рослини-індикатори: *Datura stramonium*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* cv. Trapeson, *N. tabacum* cv. Samsun, *Tetragonia expansa*, *Licopersicon esculentum*, *Phaseolus vulgaris*, *Petunia hybrida*.

Для отримання асептичної культури гербери *in vitro* використовували квіткові бруньки рослин, в яких методом ІФА віруси не виявлялися. Стерилізацію первинних експлантів проводили шляхом послідовної обробки хлораміном, тимеросалом та етанолом за розробленою нами схемою.

Асептичну роботу проводили у настільному боксі Моржицького. Культивування тканин *in vitro* здійснювали на модифікованих живильних середовищах MS (Murashige & Skoog, 1962), що містили повну і половинну концентрацію макросолей, а також макросолі MS в поєднанні з мікросолями Хеллера. Експланти культивували за температури + 23°C і 16-годинного фотоперіоду.

Періодичність субкультивування складала 3 – 6 тижнів. Для дослідження процесів морфогенезу в живильне середовище додавали фітогормони БАП, ІОК, НОК.

Статистичну обробку експериментальних даних (Лакін, 1980) проводили за допомогою ПЕОМ на базі Intel-Pentium III з використанням прикладних програм Microsoft.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Обстеження промислових насаджень гербери на наявність вірусної інфекції. Свою роботу ми почали з візуальних обстежень підприємств, котрі вирощують герберу. За період 1997 – 2002 роки досліджувались тепличні господарства міста Києва: ВАТ „Агрофірма Троянда”, держагрофірма „Квіти України” та СТОВ „Теремки”. Крім цих господарств, нами проводилось обстеження селекційного комплексу гербери

Таблиця 1.

Результати візуальних обстежень промислових насаджень гербери в досліджених нами господарствах

Господарства	„Агрофірма Троянда”	„Квіти України”	„Теремки”	НБС
Симптоми				
мозаїчність листкової пластинки	12,5±0,6	11,4±0,3	1,0±0,1	5,3±0,1
некротична плямистість	23,2±0,9	7,5±0,4	не виявлено	3,2±0,2
лійковидне закручення листкової пластинки	6,4±0,4	21,5±0,3	не виявлено	6,4±0,1
зморшкуватість листкової пластинки	27,4±0,5	9,9±0,4	1,0±0,1	10,1±0,4
жовтяниця	37,7±1,1	6,5±0,4	не виявлено	26,3±0,4
хлороз листкової пластинки	43,5±1,3	8,9±0,5	1,2±0,1	27,4±0,3
затримка розвитку рослини	37,5±1,1	5,1±0,1	не виявлено	14,1±0,2
зів’янення квіткових бруньок	9,6±0,4	4,3±0,3	не виявлено	4,7±0,1
засихання недорозвинених суцвіть	14,3±0,5	6,2±0,2	не виявлено	4,5±0,2
асиметрія розвитку суцвіття	13,3±0,3	4,1±0,1	не виявлено	5,2±0,2
витонченість суцвіття	11,3±0,3	2,9±0,1	не виявлено	4,1±0,1
зміна забарвлення суцвіття	9,4±0,4	2,5±0,1	не виявлено	5,1±0,1

Примітка: числові дані виражають % уражених рослин і стандартне відхилення від середнього значення.

в Нікітському ботанічному саду Національного наукового центру УААН. У всіх господарствах, за винятком СТОВ „Теремки”, симптоми ураження були подібними, незважаючи на значні відмінності за географічним розташуванням, екологічними умовами вирощування та сортовими особливостями (табл. 1).

Найпоширенішими з них були хлороз, мозаїка, некротизація, закручування листкової пластинки та затримка розвитку рослини. Найгірший фітосанітарний стан мали рослини ВАТ „Агрофірма Троянда”, де основними симптомами були зморшкуватість листкової пластинки, жовтяниця, хлороз, некротизація та затримка розвитку. Дещо краща картина спостерігалась у держагрофірмі „Квіти України”. Найпоширенішими симптомами тут були: лійковидне закручення та мозаїчність листкової пластинки. Можливо, таку картину можна пояснити тим, що ці господарства вирощували рослини гербери впродовж чотирьох та більше років і за досить тривалий проміжок часу відбувалось перезараження рослин різними фітопатогенами.

При візуальному обстеженні рослин СТОВ „Теремки”, де ретельно дотримувались агротехнічних умов вирощування, нами реєструвались лише поодинокі мало виражені симптоми мозаїки, хлорозу та зморшкуватості листкової пластинки.

Необхідно зазначити, що київські підприємства вирощують переважно імпортовану герберу на відміну від Нікітського ботанічного саду, де розводять сорти власної селекції.

На рослинах з вищеназваними симптомами в багатьох випадках були зареєстровані комахи-шкідники, які можуть виступати переносниками вірусів.

Для з’ясування природи ушкодження рослин гербери ми застосували метод непрямого імуноферментного аналізу. Адже симптоми, подібні до вірусних, можуть з’являтися на рослинах і внаслідок пошкодження комахами та нематодами, ураження грибами та бактеріями або через порушення агротехнічних умов вирощування рослин.

В ході експерименту була здійснена постановка ІФА з рослинним матеріалом гербери окремо по кожному з обстежених господарств.

За допомогою ІФА нами показано відповідність між візуальними симптомами, описаними раніше, і наявністю вірусних антигенів в уражених рослинах, що свідчить про вірусну природу захворювання; показано можливість прихованої вірусної інфекції, яка становить загрозу за

мультиплікації посадкового матеріалу; а також виявлено антигенні білки не описаного раніше вірусу, які реагували з сироватками до різних вірусів з родини *Potyviridae* (табл. 2).

Таблиця 2.

Результати виявлення вірусних антигенів методом непрямого ІФА

Назва господарства	„Агрофірма Троянда”	„Квіти України”	„Теремки”	НБС
Виявлені антигени	УВК, ВПЗП	УВК, ВТМ	ВТМ	ВТМ, ВПЗП

Поряд з ІФА ми застосовували метод електронної мікроскопії (ЕМ) та біотестування. Для дослідження використовували надземну частину уражених рослин. Досліджуючи матеріал за допомогою трансмісивної електронної мікроскопії, ми виявляли різні за морфологією вірусні частки, які мали вигляд гнучких і жорстких паличок та сферичних поліморфних часток (табл. 3). Паличковидний вірус, за морфологічними показниками подібний до вірусу тютюнової мозаїки (ВТМ), виявлявся у держагрофірмі „Квіти України” та СТОВ „Теремки”. Рослини саме цих господарств у реакції ІФА реагували з імунною сироваткою до ВТМ. Поєднання результатів ІФА та ЕМ дають підставу стверджувати, що рослини гербери держагрофірми „Квіти України” та СТОВ „Теремки” були інфіковані саме ВТМ. Ікосаедричний вірус реєструвався лише у ВАТ „Агрофірма Троянда” і, ймовірно, є вірусом плямистого зів’янення томатів, що підтверджується даними ІФА соку рослин цього господарства.

Таблиця 3.

Дослідження інфекційного соку з рослин гербери методом електронної мікроскопії

Господарства	Морфологія віріонів		
	сферичні d, нм	паличковидні, нм	ниткуваті, нм
Агрофірма Троянда	80±5	-	705±4 Ч 13 нм
Квіти України	-	300±2 Ч 18	705±4 Ч 13 нм
Теремки	-	300±2 Ч 18	-

На нашу думку, найцікавішими є нитковидні вірусні частки довжиною близько 705 нм. (рис. 1), співвідношення довжини та ширини віріона складає $54,44 \pm 0,01$. Зразки рослинного матеріалу, в яких виявлявся цей вірус в реакції ІФА, реагували з сироваткою до У-вірусу картоплі, хоча літературних відомостей про ураження гербери потівірусами ми не знайшли.

Рис. 1. Електронограма ниткуватого віріона з соку уражених рослин гербери (X 35 000)

Характеристика нитковидного вірусу, виявленого на гербері. Для з’ясування біологічних властивостей виявленого вірусу нами було проведено тестування на рослинах-індикаторах, які інфікували методом механічної інокуляції соком з уражених рослин гербери. Симптоми захворювання розвивались протягом 2 – 4 тижнів з моменту зараження (табл. 4).

Таблиця 4.

Реакція рослин-індикаторів на зараження виявленим потівірусом

Рослини-індикатори	Симптоми	
	локальні	системні
<i>Datura stramonium</i> L.	відсутні	некрози
<i>Gomphrena globosa</i> L.	некрози з червоною обляміркою	відсутні
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste et Reyn.	відсутні	строката мозаїка

<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	відсутні	відсутні
<i>N. tabacum</i> cv. Trapeson	відсутні	відсутні
<i>N. tabacum</i> cv. Samsun	відсутні	відсутні
<i>Tetragonia expansa</i> Murr.	відсутні	некрози
<i>Licopersicon esculentum</i> Mill.	відсутні	мозаїка
<i>Petunia hybrida</i> Hort.	відсутні	відсутні

Симптоми, розвиток яких ми спостерігали на рослинах-індикаторах, підтверджують інфекційну природу збудника, а в поєднанні з результатами ІФА та ЕМ дають підставу стверджувати про вірусну етіологію захворювання.

Подальше дослідження виявленого вірусу було спрямоване на його виділення та концентрацію. Після трьох циклів диференційного центрифугування ми визначали чистоту виділеного вірусного препарату спектрофотометричним методом. Для цього вимірювали спектр поглинання ультрафіолетового випромінювання в межах довжини хвилі 240 – 300 нм. (Калинина и др., 1998) і визначали співвідношення $E_{260/280}$, яке становило 1,32.

З метою отримання додаткової інформації про виділений вірус та для визначення молекулярної маси структурного білка виділеного вірусу було проведено аналітичний електрофорез у поліакриламідному гелі за Лемлі з використанням ДСН (ПААГ - ДСН).

В треках кожного з дослідних зразків спостерігався один основний білковий компонент. Обрахунок молекулярної маси його, за калібровочною кривою залежності I_g молекулярних мас від довжини пробігу маркерних білків, становив $36 \pm 0,5$ кДа (рис. 2).

Рис. 2. Електрофореграма капсидного білка виділеного вірусу:

У треках з дослідними зразками також спостерігалась незначна кількість поліпептидів з молекулярними масами більше 40 кДа (див. рис. 2). Оскільки концентрація цих білків не залежала від способу очистки вірусного препарату, ми вважаємо, що це є домішки рослинних білків, які теж виявлялися спектрофотометрично.

Отримання безвірусного посадкового матеріалу гербери *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook.

Біотехнологічний процес отримання та вирощування безвірусного посадкового матеріалу – багатостадійний (рис. 3). На першому етапі проводили пошук здорових рослин, які б могли бути використані для подальшої мультиплікації. Рослини без зовнішніх симптомів ураження перевіряли на вірусоносійство методом ІФА.

У своїй роботі для введення гербери в культуру *in vitro* ми використовували квіткові бруньки рослин, котрі не давали позитивної реакції на наявність вірусів методом ІФА. Використовуючи диски з листової пластинки, ми отримали калус, проте регенерації рослинного організму з цього калусу не відбувалось.

Обов'язковим етапом отримання асептичної культури рослинних клітин, тканин або окремих органів *in vitro* є стерилізація вихідного матеріалу. В нашій роботі ми порівнювали дію різних стерилізуючих агентів на експланти гербери, зокрема: етилового спирту, хлораміну, розчину гіпохлориту кальцію, перекису водню та комерційного препарату - тимеросалу.

Експериментальним шляхом було підібрано оптимальні умови стерилізації квіткових бруньок гербери, які полягають у послідовній стерилізації в розчинах 1% хлораміну (7 хв.), 1% тимеросалу (8 хв.) та 70% етанолу (1 хв.).

Після стерилізації для звільнення від ендогенних фітогормонів квіткові бруньки висаджували на живильне середовище, позбавлене регуляторів росту, а через 7 - 10 діб субкультивували життєздатні, не контаміновані мікрофлорою експланти на повноцінне середовище.

Відомо, що регенерація та клональне мікророзмноження рослин гербери дещо ускладнені у зв'язку з відмінністю морфогенетичної реакції різних її сортів на склад поживного середовища та співвідношення регуляторів росту. Через це умови для кожного сорту доводиться підбирати

окремо. Нам вдалося індукувати непряму регенерацію рослин гербери сортів „Роулетта" та „Циган" (рис. 4).

Рис. 3. Технологічна схема отримання та вирощування безвірусних рослин

Рис. 4. Індукція непрямої регенерації рослин гербери на модифікованому середовищі MS

У своїх дослідженнях за основу всіх модифікацій ми використовували поживне середовище Мурасіге-Скуга, яке за літературними джерелами найчастіше використовується для інших культур (Murashige & Skoog, 1962). Змінюючи концентрацію та співвідношення мінеральних солей, а також вітамінів та регуляторів росту, ми оцінювали ефективність кожної модифікації за здатністю індукувати регенерацію рослин, за швидкістю регенерації та морфологією отриманих регенерантів. Серед усіх перевірених модифікацій нами було відібрано чотири основних (табл. 5). Нами експериментально було визначено умови культивування та клонального мікророзмноження гербери *in vitro*, термін непрямої регенерації пагонів, який складав 2 - 6 тижнів у різних варіантах поживного середовища, а також визначено максимальний термін культивування калусної тканини в наших модифікаціях поживного середовища. Він становив 11 - 12 місяців. Адже за тривалого багатократного субкультивування калусної тканини в її клітинах накопичується цитогенетична мінливість, яка призводить до втрати здатності пагоно- та коренеутворення (Калинин и др., 1992). З іншого боку, відомо, що високі концентрації фітогормонів впливають на морфофізіологічні особливості рослин, зокрема підвищення концентрації цитокінінів може спричинити збільшення частоти виникнення хромосомних аберацій і виникнення аномальних пагонів (Мелик-Саркисов и др., 1994).

Таблиця 5.

Склад підібраних поживних середовищ для культивування гербери *in vitro*

Варіанти Компоненти	Концентрація компонентів поживного середовища (мг/л)			
	1	2	3	4
макроелементи	MS	S MS	MS	MS
мікроелементи	MS	MS	MS	Хеллера
хелатоване залізо	MS	MS	MS	MS
сахароза	30000	30000	45000	30000
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	85	-
аденін-сульфат	10	10	10	10
гліцин	10	10	10	10
мезоінозитол	100	100	100	100
тіамін-HCl	500	500	30	10
піридоксин-HCl	125	125	10	10
нікотинамід	250	250	10	-
кальцію D (+) пантотенат	250	250	-	-
холінхлорид	125	125	-	-
p-амінобензонат	25	25	-	-
біотин	2,5	2,5	2,5	2,5
цианокобаламін	2,5	2,5	-	-
БАП	5	5	10	10
ІОК	-	-	0,5	-
НОК	0,1	0,3	-	1
агар	7000	7000	7000	7000
pH	5,5	5,5	5,5	5,5

Укорінення рослин-регенерантів гербери ми проводили на поживному середовищі, яке відрізнялося від стандартного підвищеною концентрацією сахарози та НОК (табл. 6), оскільки стимуляція коренеутворення є найбільш вираженим органогенним ефектом для ауксинів.

На цьому середовищі формування нормальної кореневої системи відбувалось за 2 - 3 тижні (рис. 5).

На основі розробленої біологічної технології нам вдалося отримати вільні від вірусу рослини гербери.

Рис. 5. Укорінення рослин-регенерантів гербери

Таблиця 6.

Склад поживного середовища для коренеутворення

Компоненти	Концентрація (мг/л)
макроелементи	S MS
мікроелементи	S MS
хелатоване залізо	S MS
сахароза	20 000
НОК	1
агар	7000
pH	5,5

ВИСНОВКИ

Вперше в Україні проведено вірусологічне обстеження промислових насаджень гербери ВАТ „Агрофірма Троянда”, СТОВ „Теремки”, держагрофірми „Квіти України” та селекційного комплексу гербери в Нікітському ботанічному саду Національного наукового центру УААН. Виявлено методами електронної мікроскопії, імуноферментного аналізу та біотестування неописаний раніше на гербері патоген вірусної природи.

Методом електронної мікроскопії показано, що гербера (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) уражується трьома вірусами паличковидної, ізометричної та нитковидної форми. Визначено морфологічні особливості цих вірусів: паличковидний - 300 ± 2 нм. Ч 18 нм., сферичний - 80 ± 5 нм., ниткоподібний - 705 ± 4 нм. Ч 13 нм.

З'ясовано методом непрямого імуноферментного аналізу, що паличковидний вірус є вірусом тютюнової мозаїки, сферичний – вірусом плямистого зів'язання томатів, а також встановлено подібність серологічних властивостей ниткоподібного вірусу до представників родини *Potyviridae*. Досліджено коло рослин-індикаторів виявленого ниткоподібного вірусу: *Gomphrena globosa* L. реагує локальними некрозами з червоною облямівкою, *Datura stramonium* L. і *Tetragonia expansa* Murr. - системними некрозами, *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn. - строкатою мозаїкою, *Licopersicon esculentum* Mill - мозаїкою.

Експериментально підібрано умови введення гербери в культуру *in vitro*, які передбачають час відбору первинних експлантів - з кінця жовтня до початку січня, - та умови їх стерилізації, які полягають у послідовній стерилізації в розчинах хлораміну, тимеросалу та етанолу.

Модифіковано склад поживного середовища для культивування гербери *in vitro* за рахунок зміни концентрації та співвідношення мінеральних компонентів і регуляторів росту, що дозволило прискорити процес мікроклонального розмноження цієї культури.

На основі розробленої технології отримано вільні від вірусу рослини - донори гербери сортів „Роулетта” та „Циган”, які знаходились у промисловому вирощуванні у ВАТ „Агрофірма Троянда”.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Компанець Т.А., Сенчугова Н.А., Бойко А.Л. Обстеження гербери на вірусоносійство за допомогою імуноферментного аналізу // Вісник КНУ Сер. Біол. - 2000. - № 31. - С. 50 - 51.

Компанець Т.А. Отримання безвірусного посадкового матеріалу гербери (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) // Вісник КНУ Сер. Біол. - 2001. - № 33. - С. 53 -54.

Компанець Т.А., Сенчугова Н.А., Снігур Г.А. Про новий вірус *Gerbera Jamesonii* Bolus ex Hook // Вісник КНУ Сер. Біол. - 2001. - №. 35. - С. 28 - 30.

Поліщук В.П., Бойко О. А., Муж Г.В., Молчанець О.В., Бисов А.С., Капустіна Н.О., Компанець Т.А., Колонюк І.О. Потівіруси в агроценозах // Захист рослин. - 2001.- № 12. - С. 19 - 20.

Компанець Т.А. Вплив різних стерилізуючих хімічних речовин на клітини *Gerbera jamesonii* при клональному мікророзмноженні // Мат. Міжн. конф. „Онтогенез рослин у природному та трансформованому середовищі”. – Львів. - 1998. - С.210 - 211.

Компанець Т.А., Сенчугова Н.А., Яцковська Л.І., Дулевич Ж.А. Біотехнологія отримання оздоровленого посадкового матеріалу *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook // Мат. II Міжн. конф. „Біоресурси та віруси". – Київ. - 1998. - С. 88, 193.

Практикум із загальної вірусології: Навчальний посібник / А.Л.Бойко, В.П.Поліщук, Л.В.Токарчук, Ж.А.Дулевич, Н.В.Тайкова, О.А.Кондратюк, О.В.Молчанець, Т.А.Компанець / За ред. А.Л. Бойка. - К.: Видавничий центр „Київський університет", 2000. - 270 с.

Компанець Т.А., Сенчугова Н.А., Дулевич Ж.А., Снігур Г.А. Про новий вірус *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook // Мат. III Міжн. конф. „Біоресурси та віруси". - Київ. - 2001. - С. 79, 185.

Компанець Т., Сенчугова Н., Снігур Г. Получение безвирусного посадочного материала герберы (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) // Науч. тр. Литовского института садоводства и овощеводства и Литовского сельскохозяйственного университета. - 2001. - Т. 20(4)-2. - С. 73 - 79.

Т.А.Компанец, Н.А.Сенчугова, Г.А.Снигур The obtaining of the *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook virus-free planting material // Proc. International symposium "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources". - Yalta. - 2002. - P. 45.

АНОТАЦІЯ

Компанець Т.А. Вірусні хвороби гербери (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) та біотехнологічні прийоми отримання її безвірусного посадкового матеріалу. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.06 - вірусологія. Київський національний університет імені Тараса Шевченка. Київ, 2002.

В роботі викладено результати обстеження промислових насаджень гербери на вірусоносійство. Описано різноманітні симптоми ураження гербери. Досліджено властивості виявлених збудників вірусних хвороб. Встановлено кореляцію між візуальними симптомами на гербері і наявністю вірусних антигенів в уражених рослинах.

Виявлено не описаний раніше на гербері вірус. Досліджено реакцію рослин-індикаторів на цей вірус, його серологічні особливості та морфологію віріона, а також визначено молекулярну масу єдиного структурного білка.

Експериментально підібрано умови введення гербери в культуру *in vitro*, які передбачають час відбору первинних експлантів та умови їх стерилізації. Модифіковано склад живильного середовища для культивування гербери *in vitro*, що дозволило пришвидшити процес мікроклонального розмноження цієї культури. На основі розробленої технології отримано вільні від вірусу рослини-донори гербери сортів „Роулетта” та „Циган”, які знаходились у промисловому вирощуванні у ВАТ „Агрофірма Троянда”.

Ключові слова: гербера, фітовіруси, ураження, *in vitro*, безвірусний посадковий матеріал.

Компанец Т.А. Вирусные болезни герберы (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) и биотехнологические приемы получения её безвирусного посадочного материала. - Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.06 - вирусология. Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко. Киев, 2002.

В работе представлены результаты обследований промышленных насаждений герберы ОАО “Агрофирма Троянда” (г.Киев), СООО “Теремки” и госагрофирмы “Квиты Украины”, а также селекционного комплекса герберы в Никитском ботаническом саду Национального научного центра УААН на вирусоносительство. Описаны разнообразные симптомы поражения герберы, основными среди них были хлороз, мозаика, некротизация, скручивание листовой пластинки и задержка роста растения. Методом непрямого иммуноферментного анализа исследована корреляция между визуальными симптомами и наличием вирусных антигенов в пораженных растениях.

На растениях герберы выявлены вирусы табачной мозаики и пятнистого увядания томатов. Также выявлен не описанный ранее на гербере вирус. Исследована реакция растений-индикаторов, серологические особенности и морфология вириона этого вируса. Вирионы нитевидной формы размерами 705±4 Ч 13 нм. В реакции ИФА вирус реагировал с сыворотками к различным вирусам

семейства *Potyviridae*, что свидетельствует о наличии общих антигенных детерминант. Выявлен один структурный белок с молекулярной массой $36 \pm 0,5$ кДа.

Экспериментально подобраны условия получения асептической культуры герберы *in vitro*, которые предполагают время отбора первичных эксплантов – конец октября – начало января, – и условия их дробной стерилизации в растворах хлорамина, тимеросала и этанола. Модифицирован состав питательных сред путем изменения соотношения и концентрации минеральных солей и регуляторов роста для культивирования и клонального размножения герберы *in vitro*, что позволило ускорить этот процесс. Установлено, что максимальное время культивирования каллуса герберы на модифицированных средах – 11-12 месяцев. На основании разработанной технологии получены свободные от вирусов растения-доноры герберы сортов “Роулетта” и “Цыган”, которые находились в промышленном выращивании в ОАО “Агрофирма Троянда”.

Ключевые слова: гербера, фитовирусы, поражение, *in vitro*, безвирусный посадочный материал.

Kompanets T.A. Virus diseases of the gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hook) and biotechnological methods of obtaining of its virus-free planting material. - Manuscript.

Thesis for degree of candidate of biological sciences (PhD) by speciality 03.00.06 - virology. Taras Shevchenko National University of Kyiv. Kyiv, 2002.

In work were represented the results of research of the industrial plantations of gerbera on viruscarrying. Manifold symptoms of a lesion of gerbera were studied. Correlation between visual symptoms and presence of viral antigens in the diseased plants are explored.

Was revealed undocumented earlier on gerbera virus. The reaction of plants -indicators, serological features and morphology virions were researched, and also the molecular mass of single structural protein of this virus is spotted.

The conditions of introduction gerbera in culture *in vitro* - time sampling initial explants and the conditions of its sterilization picked experimentally. The composition of nutrient mediums for cultivation of gerbera *in vitro* are modified, that has allowed to speed up process of clonal micropropagation. On basis of designed technology of obtaining the virus-free gerberas plants of the sorts "Rouletta" and "Cigan" has been carried out.

Key words: gerbera, phytoviruses, disease, *in vitro*, virus-free planting material.