

АНОТАЦІЯ

Павлюк Л. В. Наукове обґрунтування удосконалення відбору безвірусних клонів у системі сертифікації садивного матеріалу вишні та черешні. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертаційна робота на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 203 «Садівництво та виноградарство» (20 — Аграрні науки та продовольство). — Інститут садівництва НААН, Київ, 2021.

У дисертаційній роботі проаналізовано вірусні хвороби вишні та черешні. Встановлено поширення патогенів на території України, вивчено молекулярно-біологічні особливості окремих ізолятів.

В Україні насадження вишні та черешні займають 49,5 % загальної площі насаджень кісточкових культур. Отже, є потреба в якісному садивному матеріалі. Лімітуючим чинником отримання як садивного матеріалу, так і стабільної та високої урожайності є вірусні патогени. Сумісність сортопідщепних комбінунвань під дією вірусів досі не з'ясована. Тому актуальним було вивчення впливу патогенів на ріст і розвиток саджанців.

Згідно з рекомендаціями Європейської і Середземноморської організації захисту рослин (ЄОЗР) та розробленим ними стандартом РМ(4)29(1) «Схема сертифікації черешні та вишні», необхідним є тестування садивного матеріалу на 15 вірусних патогенів. Оскільки до часу планування наших досліджень у насадженнях вишні та черешні ідентифіковано лише п'ять вірусів, то актуальним є проведення фітовірусологічного моніторингу на розширену панель вірусів. Отримані результати досліджень дали можливість з'ясувати наявність і поширення патогенів у насадженнях, а вивчення молекулярно-генетичних характеристик виділених ізолятів дало змогу з'ясувати їх мінливість, походження та вплив на рослину. Отже, проведені дослідження актуальні.

Новизна досліджень полягає в ідентифікації панелі патогенів вишні, черешні та їхніх підщеп відповідно до стандарту РМ(4)29(1). Уперше в Україні проведено моніторинг насаджень вишні, черешні та їхніх підщеп на 10 вірусів зі стандарту РМ(4)29(1), а також ВШС — одного з найбільш шкочочинних вірусних патогенів кісточкових. Визначено, що інфікованість насаджень вишні становить 33 %, черешні — 30,6 %, підщеп — 13 %. Уперше в насадженнях вишні, черешні та їхніх підщеп виявлено низку патогенів: вірус зіркоподібної мозаїки петунії (ВЗМП), вірус чорної кільцевої плямистості томату (ВЧКТ), вірус мозаїки яблуні (ВМЯ), вірус мозаїки резухи (ВМР), вірус кільцевої плямистості малини (ВКПМ) та вірус латентної кільцевої плямистості суниці (ВЛКПС). Проведено філогенетичний аналіз ізолятів вірусу некротичної кільцевої плямистості кісточкових (ВНКП), вірусу карликовості сливи (ВКС), які виділені з рослин вишні та черешні, а також вірусу шарки сливи (ВШС), виділеного з вишні магалебської. Виявлено, що ізоляти ВНКП належать до різних груп, які, зі свого боку, як помірно, так і виражено негативно діють на рослину.

Вивчено вплив вірусних патогенів на сорто-підщепні комбінування та функціональний стан вишні та черешні.

З метою вивчення фітовірусологічного стану насаджень вишні, черешні та їхніх підщеп проведено тестування рослинного матеріалу на 10 вірусних патогенів, визначених ЄОЗР, а також ВШС, оскільки цей вірус небезпечний для всіх кісточкових культур. Основним методом тестування була серологічна діагностика, оскільки вона дає змогу надійно встановити вірусний статус рослин і призначена для проведення аналізу великої кількості матеріалу.

За роки досліджень протестовано 291 зразок, із них черешні — 134, вишні — 103, підщеп — 54 зразки. Рослинний матеріал відібраний у десяти областях України в господарствах різних форм власності. Під час досліджень виявлено всі вірусні патогени, на які проводили тестування. Серологічна діагностика зразків показала високий рівень інфікованості матеріалу — 28,6 %. Найбільша частка

інфікованих зразків зафіксована в матеріалі вишні — 33 %, черешні — 30,6 %, а найменша — у перевірених зразках підщеп — 13 %. З виявлених вірусів переважав ВНКП, а саме в зразках вишні — 14 %. Двома і більше вірусами досліджувані культури інфіковані в межах 5,5—9,7 %.

Установлено, що інфікованість перевірених сортів черешні коливається від 23 до 45,5 %, залежно від сорту; вишні — від 7,1 до 42,9 %, а підщеп — 4,2 (ВСЛ-2) та 33,3 % (вишня магалебська). Попри значний відсоток інфікованості сортів, вдалося відібрати чисті клони для подальшого розмноження й закладання промислових насаджень. Загалом виділено 209 зразків, із них рослин черешні — 95, вишні — 67, підщеп — 47.

Для достовірної серологічної діагностики ВНКП і ВКС підібрано оптимальні строки й типи тканин рослинного матеріалу для ефективного виявлення патогенів. Найвищі вірусні титри зафіксовані в матеріалі листків навесні (квітень-травень), тоді як тестування у жовтні дає хибно негативні результати.

Для проведення філогенетичного аналізу обрали ізоляти ВНКП і ВКС, виділені з рослин вишні та черешні, а також ізоляти ВШС — з насінневої підщепи вишні магалебської. Під час дослідження сиквензовані ізоляти були депоновані до світового генетичного банку – GenBank NCBI із присвоєнням відповідних номерів.

На основі аналізу послідовності нуклеотидів ВНКП встановлено, що виділені ізоляти належать до різних груп: PV-96 (MT828889) та PV-32 (MT892676), які циркулюють у Київській та Запорізькій областях. Симптоми відрізняються залежно від штамової належності патогену, це пояснює той факт, що деякі інфіковані рослини не проявляють симптомів захворювання. Кластеризація ізолятів підтвердила наявність трьох груп, які не залежать від рослини-господаря та географічного походження.

Філогенетичний аналіз ВКС установив, що вітчизняні ізоляти MT828888 і MT828887 мають високу ідентичність — 99,6 %. Найближчим до них виявився словацький ізолят виділений із черешні, його ідентичність із вітчизняним становила 94,9—95,3 %. Під час кластеризації сформувалися дві групи з розподілом на дві підгрупи. У нашому випадку до другої групи ввійшли лише черешневі ізоляти, що може свідчити про існування окремого кластера, сформованого на основі рослини-господаря.

Оскільки виділені ізоляти ВШС на 100 % подібні між собою, до Генбанку депонували лише один — MW055900. Встановлено, що цей ізолят належить до штаму D і не є типовим господарем для вишні. Це свідчить про пристосування вірусу до нових рослин-господарів, а отже, становить загрозу для більшого кола культур.

Для вдосконалення схеми сертифікації запроновано внести зміни до чинних документів, а саме: ДСТУ 4791:2007 «Підщепи плодових культур. Методи визначення якості» та ДСТУ 4792:2007 «Саджанці плодових культур. Методи визначення якості». Потребує уточнення панель патогенів, що відображені в їхніх додатках D. Зважаючи на склад ідентифікованих патогенів на території України, необхідно визначити такий їх перелік для тестування рослинного матеріалу: вірус мозаїки яблуні (ВМЯ), вірус некротичної кільцевої плямистості кісточкових (ВНКП), вірус карликовості сливи (ВКС), вірус мозаїки резухи (ВМР), вірус скручування листя черешні (ВСЛЧ), вірус чорної кільцевої плямистості томату (ВЧКТ), вірус кільцевої плямистості малини (ВКПМ), вірус латентної кільцевої плямистості суниці (ВЛКПС), вірус хлоротичної плямистості листя яблуні (ВХПЛЯ), вірус зіркоподібної мозаїки петунії (ВЗМП) та вірус шарки сливи (ВШС).

Під час вивчення сортопідщепних комбінувань досліджено реакцію чутливих підщеп на щеплення інфікованими окулянтами. У підщепи ВСЛ-2 та ЛЦ-52 спостерігали камедетечу на місці щеплення, а згодом і зміну кольору

листіків на антоціанове забарвлення. Інтенсивність забарвлення була різною — інтенсивно-червоне спостерігали на ВСЛ-2, тоді як на ЛЦ-52 воно було менш яскраве. Також на цих підщепах навесні спостерігали 100 % випадів у другому полі розсадника. На відміну від попередніх підщеп, на ВЦ-13 подібних реакцій не зафіксовано. Приживлюваність інфікованих окулянтів становила 50 % із сортом Ніжність і 76,6 % із сортами Богуславка та Ксенія, тоді як у неінфікованих контрольних рослин цей показник становив 90 %.

Під час спостережень за динамікою росту досліджуваних рослин відмічали, що деякі інфіковані бруньки залишалися у стані спокою, в той час як здорові окулянти починали відростати.

Вплив патогенів на функціональний стан рослин вишні та черешні вивчали на інфікованих і неінфікованих рослинах у другому полі розсадника. Виявлено негативну дію вірусу на стан фотосинтезуючого апарату рослини. Загалом фіксували зменшення хлорофілу *a* від 20,9 до 38 %, хлорофілу *b* від 31 до 43,9 %, залежно від сорту й вірусу, що інфікував рослину. Методом індукції флуоресценції хлорофілу листків встановлено, що в саджанцях із вірусною інфекцією, якщо порівнювати з безвірусними, флуоресценція хлорофілу зростає в усьому часовому діапазоні реєстрації її індукційних змін. Також виявлено, що віруси некротичної плямистості й карликовості сливи негативно впливають на морозостійкість генеративних бруньок досліджуваних сортів. Визначено, що вірусне навантаження на рослину спричинило пошкодження бруньок інфікованих сортів Ксенії (ВНКП) і становить 3,5—4,5 бала, а Богуславки (ВКС) — 4,5, водночас у здорових (контрольних) рослинах рівень пошкодження — від 1,7 до 3,5 бала, залежно від температури, патогену й сорту. Під час вивчення впливу вірусної інфекції на якість однорічних саджанців фіксували зменшення площі листової пластинки на 7,6—31 %, залежно від патогену й сорту рослини. Натомість питома поверхнева щільність у інфікованих сортів Богуславка (ВКС) та Ніжність (ВКС + ВНКП) була більшою на 5,5 і 39,9 % відповідно, тоді як у

сортозразка Ксенія (ВНКП) цей показник був меншим від контролю на 27,4 %. Підвищення питомої поверхневої щільності листків (ППЩЛ) в деяких варіантах вплинуло на збільшення вмісту води в клітинах: у зразках Богуславка на 1,4 %, Ксенія — 5,7 %, натомість під час комплексного інфікування сорту Ніжність фіксували зменшення оводненості на 20,2 %.

Під час аналізу параметрів вирощених саджанців простежується тенденція до зменшення середнього діаметру штамбу під впливом вірусного інфікування. У саджанців черешні сорту Ніжність діаметр штамбу зменшується на 18,8 %, у сорту вишні Богуславка — на 13,3 %. Винятком стали рослини вишні сорту Ксенія, де не фіксували різницю між інфікованими рослинами й контролем. При цьому середня висота саджанців зменшується на 3,1 і 13 % у сортів вишні Богуславка та Ксенія відповідно, а в черешні Ніжність — на 36,3 %.

У ході досліджень підраховано, що використання інфікованого матеріалу для вирощування саджанців зменшує їх вихід, якщо порівнювати з використанням вільного від вірусів матеріалу. Загалом було отримано лише 8,88 тис. шт. / га рослин сорту Богуславка, 11,1 і 26,64 тис. шт. / га сортів Ніжність і Ксенія відповідно. Водночас у контрольних варіантах цей показник становив 49,95 тис. шт. / га.

Розрахунки економічної ефективності вирощування саджанців свідчать про збільшення рентабельності при використанні тестованого на віруси садивного матеріалу.

Отже, проведені дослідження забезпечують оцінювання фітовірусологічного стану насаджень вишні, черешні та їхніх підщеп в Україні. Моніторинг насаджень дає змогу знешкодити осередок інфікування й запобігти подальшому поширенню вірусів. Велике практичне значення має виділення чистих клонів, які надалі можуть бути використані як садивний матеріал.

Ключові слова: віруси, ІФА, ЗТ-ПЛР, філогенетичний аналіз, хлорофіли, динаміка росту, саджанці.