

НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

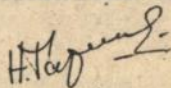
На правах рукопису

ТАРАНУХО МИКОЛА ПАВЛОВИЧ

ЗОВНІШНІ ТА ВНУТРІКЛІТИННІ АНОМАЛІЇ РОСЛИН -
ДІАГНОСТИЧНІ ОЗНАКИ ВІРУСНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ
КІСТОЧКОВИХ І ЯГІДНИХ КУЛЬТУР ПРИ ДОВОРІ
БЕЗВІРУСНИХ КЛОНІВ

Спеціальність 03.00.21 - фітопатологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук



Київ - 1996

38 д. 28
AB 36.002
Роботу виконано на кафедрі фітопатології Національного аграрного університету і в лабораторії біологічних наук ВААН (м. Київ).

Наукові керівники: доктор

кандидат

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00757197 (-)

ГРИШАК ЛАРИСА КХИМІВНА

Офіційні опоненти: академік АН України, доктор біологічних наук, професор
КИШКО ЯРОСЛАВ ГРИГОРОВИЧ;
кандидат біологічних наук, доцент
ДУЛЕВИЧ ЖАННЕТА АНАТОЛІЇВНА

Провідна організація: Уманська сільськогосподарська академія

Захист дисертації відбудеться "29" листопада 1996 року о "10" годині на засіданні Спеціалізованої вченої ради в Національному аграрному університеті (корпус 3, аудиторія 65).

Просимо взяти участь у засіданні Ради або прислати відгук на автореферат у двох примірниках, завірених печаткою, на адресу: 252041, Київ - 41, вул. Героїв оборони, 15, сектор захисту дисертацій.

З дисертаційною роботою можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного університету.

Автореферат розісланий "___" _____ 1996 року.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради
кандидат сільськогосподарських наук, доцент

А.Г. БАБИЧ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Одним з істотних резервів подальшого підвищення врожайності кісточкових та ягідних культур є захист їх від шкідників і хвороб. Серед останніх особливо небезпечні вірусні. Вітчизняний та зарубіжний досвід свідчить, що єдиним ефективним заходом захисту кісточкових і ягідних рослин від цих хвороб є система санітарної селекції, що базується на вирощуванні елітного садивного матеріалу.

Тому великого значення набувають методи діагностики вірусів і особливо електронної мікроскопії, що дають змогу побачити вірусні частки, встановити їх форму, розмір, локалізацію в тканинах і виявити аномалії в уражених клітинах рослин. Все це й визначило напрям наших досліджень.

Мета і завдання досліджень. Метою роботи є вивчення зовнішніх і внутріклітинних аномалій у кісточкових і ягідних рослин як діагностичних ознак вірусних хвороб при вирощуванні здорового садивного матеріалу. За допомогою аналізу виявлених семи вірусів належало розв'язати такі завдання:

- оцінити можливість використання зовнішніх аномалій у рослин-хазаїв та рослин-індикаторів для попередньої ідентифікації абудників;

- показати можливість застосування методу електронної мікроскопії для ідентифікації вірусів на базі їх морфології, структури та характеру локалізації;

- використовуючи комплекс методів детекції вірусів, встановити їх поширення в різних екологічних зонах;

- застосувати зовнішні та внутріклітинні аномалії рослин при доборі безвірусних клонів;

- одержати вихідний безвірусний садивний матеріал районованих і перспективних сортів кісточкових та ягідних культур для закладання маточних насаджень.

Про наукову новизну досліджень свідчать такі результати:

- виявлено природнє зараження в Україні вишні повстистої вірусом шарки сливи, яку в літературі описано як експериментального хааяїна цього вірусу; досліджено його локалізацію, а також структуру включень у клітинах уражених рослин. Особливості локалізації

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

вірусу в тканинах, коло сприйнятливих рослин-хазяїв і характер симптомів на трав'янистих індикаторах дозволили віднести ізолат шарки на вишні повстистій до хлоротичного штамму вірусу шарки за класифікацією, запропонованою Sutic (1971);

- вперше на рослинах смородини чорної з симптомами безплідності виявлено бациловидний вірус, локалізований в ядрі, перинуклеарній зоні та цитоплазмі;

- на рослинах малини з симптомами хлоротичної плямистості вздовж жилок вперше в Україні виявлено бациловидний вірус, локалізований у цитоплазмі. Він ідентичний описаному за рубезем вірусу хлорозу жилок малини (Jones et al., 1977);

- вперше на рослинах цієї ж культури з симптомами жовтої плямистості виявлено великий поліедральний вірус, локалізований у перинуклеарній зоні та цитоплазмі.

Практична цінність роботи полягає в тому, що за результатами тестування на рослинах-індикаторах та імуноферментного аналізу (ІФА) відібрано безвірусні клони 10 сортів вишні, 4-черешні, 2-сливи, 2-абрикоса, 2-аличі, 19-смородини чорної, 7-порічки червоної, 4-малини, а також маточно-насінні дерева дикої черешні для подальшого розмноження.

Реалізація результатів досліджень. За технологією виробництва безвірусного садивного матеріалу в лабораторії вірусології Інституту садівництва УААН (ІС УААН, Київ) створено елітний маточний фонд кісточкових і ягідних культур. Крім того, закладено суперелітний (СЕ) маточно-живцевий сад кісточкових (150 дерев). Протягом 1992-1993 років на базі супер-суперелітного (ССЕ) маточника вирощено й передано дослідним господарствам інституту 4,1 тис. СЕ саджанців і 38 тисяч живців 13 сортів смородини чорної, а також 7 тисяч СЕ саджанців двох сортів малини для створення суперелітного та елітного маточників.

Апробація роботи. Основні положення дисертації викладено в доповідях на конференціях молодих учених: "Проблеми сучасного садівництва" (Київ, 1989), "Проблеми інтенсифікації сучасного садівництва" (Мічуринськ, 1990) і на засіданні вченої ради Інституту садівництва УААН (м. Київ, 1991-1995 рр.). За матеріалами дисертації опубліковано сім праць.

Декларація особистого внеску. Дисертант особисто планував і проводив лабораторні та вегетаційно-польові дослідження, виконував усі

технологічні операції, обліки, спостереження, аналіз дослідних даних, брав безпосередню участь у вишуванні безвірусного садивного матеріалу.

На захист виносяться результати досліджень зовнішніх і внутріклітинних аномалій у кісточкових і ягідних рослин та добору безвірусних клонів.

Структура та обсяг дисертації. Роботу викладено на 144 сторінках машинописного тексту. Вона включає вступ, 9 глав, висновки та практичні рекомендації. Містить 11 таблиць, 21 рисунок. Список використаної літератури включає 234 праці, з них 172 іноземних авторів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом служили сорти вишні, черешні, сливи, чорної смородини, порічки та малини з промислових і колекційних насаджень ІС УААН (м. Київ) і його дослідної мережі (Донецький та Львівський філіали, Краснокутська, Подільська та Придністровська дослідні станції садівництва (ДСС)), а також араки з симптомами вірусних і вірусоподібних захворювань, які виявляють візуально при обстеженні насаджень цих культур.

Для підтвердження вірусної етіології виявлених захворювань, ідентифікації їх збудників, а також при фітосанітарному доборі безвірусних клонів застосовували методи діагностики на трав'янистих і деревних індикаторах, ІФА, імуоелектронну мікроскопію (ІЕМ), електронну мікроскопію ультратонких зрізів.

Трав'янисті рослини-індикатори 13 видів із 5 родин інфікували за допомогою механічної інокуляції. Як інокулом використовували бруньки, бутони, пелюстки та молоді листки кісточкових порід і кущових ягідників. Одержували інокулом за допомогою ростирання рослинних тканин з додаванням стабілізуючих сумішей: 0,03 М фосфатний буфер рН 8,0 + 0,2 % аскорбінова кислота + 0,2 % Na_2SO_3 + 0,03 М кофеїн; 2 % розчин нікотин-основи; 0,05 М калієво-фосфатний буфер рН 7,0 + 2 % polyvinylpyrrolidon.

Використовували види та сорти індикаторів, рекомендовані Типовими методиками, прийнятими спеціалістами країн-членів РЕВ: для черешні, вишні та сливи - Schirofugen, Binq, Sam, Kwanzan, Prunus tomentosa, Malus platycarpa, Уропка італійська; смородини та мали-

ни - сіянці смородини чорної сортів Амос Блек, Кент, Велінгтон; порічки червоної сортів Йонкер Ван Тетс, Голландська червона, а також сіянці малини (Ллойд Джордж, Норфолк Джайент, Моллінг Експлойт, *Rubus occidentalis*).

Для проведення ІФА та ІЕМ використовували сироватки до вірусів некротичної кільцевої плямистості, хлоротичної кільцевої плямистості, хлоротичної кільцевої плямистості листя яблуні та шарки сливи, одержані в лабораторії вірусології Молдавського НДІ садівництва.

При вивченні вірусів у сирих екстрактах застосовували методи, описані Johnson (1951), Brandes (1957), Проценком, Легунковою (1962), Hitchborn, Hills (1965), Ларіною зі співавт. (1974).

Як речовини, що контрастують негативно, використовували розчини 2 % фосфорно-вольфрамової кислоти рН 7,2 та 2-3 % уранілацетату.

Перегляд і фотографування препаратів проводили в електронному мікроскопі ЕМВ-100 А за прискорювальної напруги 75 кВ.

Обчислення нормальної та модальної величин часток досліджуваних вірусів виконували за методикою Плохінського (1970).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. Поширення вірусних захворювань кісточкових і ягідних культур

Для встановлення поширеності вірусних захворювань кісточкових рослин обстежували насадження у Київській, Львівській, Донецькій, Харківській, Вінницькій та Чернівецькій областях. Зараження виявляли за зовнішніми ознаками і за допомогою відбору зразків для біотесту на рослинах-індикаторах, а також імуноферментного аналізу. В результаті тестування в садах кісточкових відмічено значне поширення вірусів кільцевих плямистостей. При цьому в більшості культур мала місце в основному латентна форма зараження.

Дослідження показали, що уражуваність вірусами кільцевих плямистостей в усіх зонах вирощування кісточкових досить висока (від 1,2 до 92,8 % залежно від культури та сорту (табл. 1)).

Таблиця 1 - Поширеність кільцевих плямистостей в різних районах вирощування кісточкових культур (1982-1995 рр.)

Місце обстеження	Уражуваність вірусами кільцевих плямистостей, %					
	вишня	черешня	слива	абрикос	клонові підщепи	насінні підщепи
ДГ "Новосілки"	62,5	28,6	7,2	35,2	52,3	31,3
ІС УААН	69,5	78,2	81,9	75,0	58,0	51,4
ДГ "Фастівське"						
ІС УААН	-	35,0	-	50,0	-	20,0
Донецький філіал ІС УААН	28,0	33,3- 42,8	10,0	-	20,0	13,0
Львівський філіал ІС УААН	85,7	60,0	26,6	-	-	-
Подільська ДСС	60,0- 62,5		50,0- 75,0	-	-	50,0- 83,3
Придністровська ДСС	35,1	1,2	-	-	-	50,0
Краснокутська ДСС	8,3	25,4	13,0	-	22,7	5,5

Водночас при обстеженні промислових насаджень сливи у Львівському філіалі Інституту садівництва УААН виявлено віруси шарки на листках та плодах на площі 20 га. Кількість уражених дерев становила 45,5 %.

Імуноферментний аналіз був успішно застосований нами для виявлення зараження дерев вірусом цієї ж хвороби в період розпускання молодих листочків, ще до проявів симптомів. Так, у маточно-живцевому саду сливи Львівського філіалу ІС УААН було вибракувано 42,8 % хворих дерев (табл. 2).

Таблиця 2 - Результати тестування вихідних дерев кісточкових культур методом ІФА на вірус шарки (1991-1992 рр.)

Порода	Кількість сортів	Кількість тестованих дерев, шт.	Кількість уражених дерев	
			шт	%
ДП "Новосілки", ДП "Дмитрівка" - ІС УААН				
Слива	6	26	0	0
Придністровська ДСС ІС УААН				
Слива	27	50	22	44
Вишня	9	11	0	0
Персик	7	14	5	35,7
Львівський філіал ІС УААН				
Слива	6	315	135	42,8

Останнім часом з'явилися повідомлення, що вірус шарки у природних умовах може вражати й вишню (Біклей, 1992). Але при тестуванні методом ІФА дев'яти сортів цієї культури, сади якої знаходилися поруч з ураженою шаркою сливою, вірус не було виявлено.

Багаторічними візуальними обстеженнями та методом ІФА не відмічено зараження дерев сливи та абрикоса цим патогеном у Київській області, а також на Подільській дослідній станції садівництва (Вінницька область).

Щоб встановити поширеність вірусних і мікоплазмових захворювань кущових ягідників в Україні було проведено обстеження промислових, колекційних і присадибних насаджень і виявлено вогнища інфекції за зовнішніми симптомами. Відмічено, що найпоширенішим захворюванням малини є кучерявість, збудник якої - вірус кільцевої плямистості малини (уражених рослин - від 10 до 100 %), жовта сітчастість (2 - 100 %), жовта плямистість (2 - 64 %). Коливання кількості уражених кущів залежало від сорту і зони вирощування. На присадибних ділянках виявлено окремі вогнища мікоплазмового захворювання малини - карликовості.

Кількість рослин смородини уражених махровістю коливалася від 2 до 10 %, зеленою крапчастістю - від 4 до 30,5 %.

2. Діагностичні ознаки вірусних хвороб кісточкових і ягідних культур

При обстеженні промислових і колекційних насаджень кісточкових і ягідних культур відмічено цілу низку зовнішніх аномалій, вірусну природу яких було доведено за допомогою зараження тест-рослин і виявлення патогенів у клітинах на ультратонких зрізах.

2.1. Симптоми рослин - хазяїв і тест-рослин

Кісточкові культури

На першому весняному листі вишні та черешні відмічено симптоми у вигляді світло-зелених концентричних кілець, а потім великих червоно-бурих плям неправильної форми. Останні в шоківій стадії можуть охоплювати більшу частину листової пластинки. Після їх некротизації та випадіння листок стає дірчастим. Сильно заражені дерева пригнічуються, в них спостерігається камедетеча і усихання окремих гілок. Такі симптоми відмічено в сортів: вишні - Гріот остгеймський, Моканешти, Любська, Подбельська; черешні - Дрогана жовта, Присадибна, Улюблена Дуки; сливи - Угорка італійська, Ренклюд Альтана, Ганна Шпет, Ода.

При серії пасажів від дерев з вивленими аномаліями на тест-рослини виявлено такі симптоми. На сім'ядолях розвивалися некротичні плями, а потім гинув або різко деформувався справжній листок, затримувався ріст і кущилися рослини огірка (*Cucumis sativus* L.) Відмічено розмиті хлоротичні, а потім некротичні плями

з пунктирними колами на інюкульованих листках лободи квіноа (*Chenopodium quinoa*), охристі некрози та хлоротичні плями із зеленим облямовуванням на сім'ядолях гарбуза (*Cucurbita maxima* L.). На однорічних пагонах вишні дрібнопильчастої Широфуген розвивався сухий некроз навколо бруньок і слабо виділялася камедь. На сіянцях персика сорту Ельберта відмічено сильну камедетечу в місці окуліровки, некрози на перших листках, усихання окремих гілочок, а потім усієї рослини. Некротична кільцева плямистість і дірчастість розвивалися на сіянцях дикої черешні, а у вишні повстистої - усихання верхівки, різке здрібніння листка.

Характер зовнішніх аномалій, виявлених на рослинах-донорах за природного інфікування та на тест-рослинах при штучному зараженні дозволили зробити висновок про зараження їх вірусом некротичної кільцевої плямистості (*Prunus necrotic ring spot virus*), що відповідає літературним даним (Fulton, 1970) і підтверджується результатами імуноферментного аналізу з антисироваткою до вірусу вищезгаданої хвороби.

Одночасно з вищеописаними зовнішніми аномаліями було виявлено й інший характер симптомів. На весняних листочках черешні спостерігали розпливчасті світло-зелені кільця й дугоподібні лінії, некротичну плямистість та порваність листя, характерну для вірусу некротичної кільцевої плямистості (ВНКП). Коли настає спека, симптоми можуть маскуватись. На деревах вишні сортів Любська та Альфа відмічено ознаки некротичної плямистості, дірчастості, а також жовтяниці. Жовте листя опадало.

У сортів сливи Угорка італійська та аличі Комета виявлено дерева з вузьким жорстким на дотик зморшкуватим листям (симптом іволистяності).

Внаслідок пасажів від дерев з виявленими аномаліями на тест-рослинах відмічено такі симптоми: темно-зелена плямистість справжнього листка огірка, жовта мозаїка на справжньому листі гарбуза, жовта мозаїчна плямистість на листках цинії, лобода квіноа не реагувала на зараження, сильна камедетеча на однорічних пагонах вишні дрібнопильчастої Широфуген навколо щеплених вічок та усихання пагона, на сіянцях персика розвивалася хлоротична кільцева плямистість, викликаючи затримку росту.

На підставі зовнішніх аномалій, виявлених на рослинах-донорах при природному інфікуванні та на тест-рослинах при штучному зараженні, ми дійшли висновку, що вони були заражені вірусом хлоротич-

ної кільцевої плямистості (карликовості сливи) (*Prunus chlorotic ring spot virus* або *Prunus dwarf virus*). Це було підтверджено даними ІФА з антисироваткою до вірусу хлоротичної кільцевої плямистості.

Слід відзначити, що в більшості випадків при тестуванні на огірках один зразок викликав розвиток двох типів симптомів (загибель справжнього листка і мозаїку), що свідчить про мішану інфекцію.

У насадженнях сливи та аличі дрібноплідної на Придністровській ДСС та у Львівському філіалі ІС УААН на молодих листках відмічено симптоми у вигляді широких кілець, плям і смуг від світло-зеленого до жовтуватого кольору, а на плодах - некротичний мозаїчний рисунок. Такі досить чіткі ознаки дозволили зробити висновок про зараження дерев вірусом шарки сливи (*Plum pox virus*), що й підтвердили дані ІФА з антисироваткою до вірусу цієї хвороби.

У садах вишні повстистої в Донецькому філіалі ІС УААН виявлено кущі із симптомами лінійного світло-зеленого візерунку на листі і темно-червоного на плодах, а в сіянцях сливи сорту Угорка італійська - у вигляді світло-зелених смуг і кілець. Перенести вірус на трав'янистий індикатор *Chenopodium foetidum* вдалося лише в початковий період утворення чітких ознак на листі вишні повстистої при використанні як стабілізуючої суміші 0,01 М Трис-буфер, яка містить 0,01 % $MgSO_4$. При цьому на натертих листках індикатора розвинулися поодинокі охристі некрози. Виходячи з цього, ми зробили припущення, що вишня повстиста була заражена вірусом шарки сливи.

Ягідні культури

На кущах смородини чорної сорту Мінай Шмирьов у період розпускання листя виявлено симптоми крапчастості та блідо-зеленої мозаїчності, а на листках, які старіли, - блідо-зелені візерунки "водяний знак", добре помітні у проходячому світлі.

На трав'янистих рослинах-індикаторах відмічено такі симптоми: охристі некрози діаметром 2-3 мм на інокульованих листках марі квіноа (*Chenopodium quinoa*), світло-коричневі некрози у вигляді концентричних кілець на лободі стінній (*Ch. murale*), жовта плямистість зі слабкою деформацією листя огірка (*Cucumis sativus*), мозаїка на листі тютюну (*Nicotiana tabacum*).

Ознаки на природно інфікованих кущах чорної смородини і на

тест-рослинах при природному зараженні дозволили ідентифікувати збудник як вірус огіркової мозаїки (*Cucumis virus 1. Smith*).

У смородини чорної сорту Голіаф вивлено кущі з симптомами мікоплазмозного захворювання - реверсії (махровість) - пригнічений приріст однорічних пагонів, асиметрична форма листка, квітки аномальні, квітковий кетяг іноді повністю перетворюється в дрібні гілочки з лусочками замість квіток (типу стовбура). Механічною інокуляцією соком збудник не передається.

У малини відмічено два типи аномалій забарвлення листкової пластинки. Перший - на листі кущів сорту Норфолк Джайент розкидані кутасті плями різних розмірів із забарвленням від яскраво-жовтого до ледве помітного світло-зеленого, розміщені вздовж вторинних жилок і за периферією пластинки. Другий - великі яскраво-жовті плями округлої чи неправильної форми, розкидані по всій пластинці. Збудник механічно, тобто інокуляцією соком на трав'янисті рослини-індикатори не передається.

Зовнішні аномалії, виявлені на смородині і малині та відсутність зараження трав'янистих рослин-індикаторів не дали змоги попередньо ідентифікувати збудників.

Для ідентифікації патогенів був застосований метод електронної мікроскопії, що дозволяє виявити внутріклітинні аномалії - вірусні частки та пов'язані з ними включення.

2.2. Вірусні частки і включення, пов'язані з ними

Вірус хлоротичної кільцевої плямистості (ВХКП). Встановлено, що в цитоплазмі клітин механічно інфікованих рослин огірків з симптомами у вигляді округлих хлоротичних плям на сім'ядолях хаотично розміщені сферичні вірусоподібні частки. Вони відрізняються від рибосом дещо більшими розмірами та чіткішими обрисами. Іноді ці частки займають весь цитоплазматичний простір. Відмічено також зв'язок їх з цитоплазматичними мембранами.

Для надійної ідентифікації часток ВХКП на ультратонких зрізах були використані методи руйнування цитоплазматичних рибосом (Honda, Matsui, 1974) та в'янення листа (Milne, 1967). Але ні чітких часток вірусу, ані його агрегатів не виявлено. Видно, такі умови інкубування інфікованих тканин непридатні для лабільних ілар-вірусів.

Можна зробити висновок, що для вірусів кільцевих плямистостей

не може успішно застосовуватись метод виявлення часток на ультратонких зрізах. Це ж підтверджують небагаточисленні літературні джерела про внутріклітинну локалізацію ілар-вірусів.

Шарка сливи. В цитоплазмі клітин листя сливи виявлено численні вclusions у вигляді електронно-щільних стрічок, завитків, розеток, які на ультратонких зрізах являють собою поперечні зрізи досить складних тримірних структур. Це - структури Едвардсона, характерні для вірусів групи потивірус, до якої належить і вірус шарки сливи. Вільні частки у клітинах не виявлені. В цитоплазмі та ядрі відмічено значну кількість кристалічних утворень, які при великому збільшенні мали поздовжнє окреслення.

При вивченні ультратонких зрізів тканин вишні повстистої з симптомами лінійного візерунка на листі і плодах виявлено чимало структур Едвардсона, а також кристалічні вclusions в цитоплазмі та ядрі, характерні для вірусів шарки сливи. Та неважаючи на це, вільні частки вірусу не відмічені. В суспензії вражених листків вишні повстистої виявлено поодинокі нитковидні частки розміром 754 x 15 нм.

З використанням методу ІЕМ концентрація вірусних часток у препаратах була дещо більшою (3-4 частки і полі зору мікроскопа).

Реакція трав'янистого індикатора *Ch. foetidum* і внутріклітинні вclusions свідчать про зараження вишні повстистої у природних умовах вірусом шарки сливи. В літературі вишню повстисту описано як експериментального хазяїна цього вірусу.

У зв'язку з тим, що ми виявили штам вірусу шарки на вишні повстистій, розпочато вивчення чутливості 18 типів клонових підщеп для сливи: АП-1, ВСВ-1, Дружба, СВГ 11-19, Маріанна, Бессея х алича, сіянець Фібінга, ВАА-2, ВВА-1, Находка, Обільна, Чересото, Зелена колона, Весняне полум'я, 21/11, ВСАП-4, Євразія 43, вишня повстиста. Через 11 місяців після зараження 12 типів підщеп проявили симптоми захворювання. Особливо яскраво вони розвинулися на листі у ВСВ-1, Маріанни, вишні повстистій, АП-1, Обільній, ВСАП-4. Підщепи Дружба, СВГ 11-19, ВВА-1, Чересото, Весняне полум'я, Євразія 43 не проявили ознак зараження. Наступного року змін не було.

Зедена крапчастість смородини. При електронно-мікроскопічних методах дослідження штучно заражених рослин лободи рисової спостерігалися віріони вірусу огіркової мозаїки (ВОМ), які вільно розміщувалися в цитоплазмі клітини впереміжку з рибосомами. В уражених паренхімних клітинах виявлено також окремі зони цитоплазми з висо-

кою концентрацією вірусу. Зони, оточені подвійною мембраною, різняться між собою розмірами та ступенем насиченості вірусом. При вивченні морфології збудника в нативних препаратах у вірусних часток була кулеподібна форма з невеликими, дуже забарвленими центральними ділянками. Вимірювання часток вірусу показало, що більшість із них була розміром 28 нм.

Безплідність смородини чорної. При дослідженні ультратонких зрізів тканин листка та аномальних пелюсток квітки смородини чорної з симптомами безплідності виявлено бацилоподібні частки, які легко ідентифікувати завдяки великим розмірам і зовнішньому вигляду, за якими вони відрізняються від подібних ознак у звичайних клітинних компонентів. Віріони головним чином розміщені у фітосомних тканинах. Типовими місцями локалізації часток вірусу є цитоплазма, ядро та перинуклеарна зона. Розмір часток на ультратонких зрізах становив 250-285 x 65-85 нм, а в нативних препаратах - 280-330 x 50-65 нм. У цитоплазмі уражених клітин зустрічаються віріони завдовжки близько 530 нм.

Комах-переносників безплідності не встановлено.

13 сортів смородини чорної та 9 - порічки червоної були заражені за допомогою щеплення їх щитком кори з брунькою від хворих кущів. На третій рік усі сорти смородини чорної та 6 - порічки проявили симптоми асиметричності та хлоротичної крапчастості листової пластинки, а в сорту Амос Блек - безплідності: квітки зовні нагадували дрібні лусочки, ягоди не формувались. Цей сорт можна рекомендувати як індикатор бацилоподібного вірусу на смородині.

Оскільки рабдовируси - вузькоспеціалізовані патогени, важко припустити, що смородина чорна може бути хазяїном одного з них, близьких за характером локалізації та розмірами до виявленого нами вірусу. Інформація про рабдовірус на цій культурі відсутня.

Хлороз жилки малини. При дослідженні ультратонких зрізів уражених листків малини виявлено зрізані поздовжньо та поперечно бацилоподібні частки, що мають складну будову. Типовим місцем їх локалізації є цитоплазма. Відмічено віріони в клітинах губчастої паренхіми, близько від судинних пучків або всередині їх, але вони були відсутні в епідермісі, палисадних клітинах, всередині ядра чи у перинуклеарній зоні. Віріони вільно розкидані по цитоплазмі або ж утворюють невеликі скупчення, оточені клітинними мембранами. Розмір часток на ультратонких зрізах - 400-490 x 70-90 нм, у нативних препаратах - 400-430 x 75 нм. За їх розмірами та морфологічними

ми ознаками, а також за характером локалізації в клітині збудник ідентифікований як вірус хлорово жилок малини (Raspberry vein chlorosis virus) (Jones et al, 1977). Ця хвороба дуже поширена в Європі та Америці. Ми вперше в Україні вивчили морфологію та структуру вірусу хлорово жилок малини і характер локалізації його в клітині.

За допомогою щеплення інфекційних вічок вірус було передано на 17 сортів малини. Через 11 місяців найчіткіші симптоми розвинулися на рослинах малини сортів Новость Миколайчука та Норфолк Джейнт. У більшості інших сортів вони проявилися в другому вегетаційному періоді з різним ступенем ураження. Сорт Вереснева залишився безсимптомним.

Жовта плямистість малини. У клітинах малини з симптомами жовтої плямистості виявлено великий поліедральний вірус розміром 85-135 нм, локалізований у цитоплазмі та перинуклеарному просторі у вигляді поодиноких часток чи агрегатів, оточених одинарною мембраною. У перинуклеарній зоні зустрічаються великі скупчення, що налічують до 100-120 вірусних часток.

При переносі цього вірусу на 10 сортів малини встановлено, що найчутливішими до нього є Ллойд Джордж і Мар'янушка. Інкубаційний період становив 11 місяців. Решта сортів проявила симптоми на другий рік після зараження.

Представником великих сферичних вірусів є вірус бронзовості томатів (Tomato spotted virus), який уражує чималу кількість рослин-хазяїв з 34 родин. Однак до їх числа не потрапила родина розовітих. Близьким до вірусу бронзовості томатів за характером локалізації є й виявлений нами патоген, але він більший за розмірами і не передається при механічній інокуляції соком. Комах-переносників не встановлено. Знайти аналогів у літературі ми не змогли. Остаточна ідентифікація збудника вимагає подальших досліджень властивостей патогена.

2.3. Зміни структури клітини та її компонентів

При вірусних інфекціях у цитоплазмі клітин хворих рослин відмічається підвищення порівняно із здоровими вміст мієліноподібних структур. Так, у кущів смородини та порічки, інфікованих ВСМ, мієліноподібні тіла зустрічаються не лише в цитоплазмі вражених клітин, але й в екстраплазматичному просторі, а у клітинах рослин ма-

лини, уражених вірусом жовтої плямистості, їх виявлено у вакуолях, зате в цитоплазмі та хлоропластах (інвагінація) вони зустрічаються рідко.

Аналіз морфології хлоропластів рослин, уражених зеленою крапчастістю та безплідністю смородини, хлоровом жилок і жовтою плямистістю малини, шаркою сливи, кільцевою плямистістю кісточкових, свідчить про те, що найбільша кількість округлих і чашоподібних хлоропластів є у клітинах малини, вишні повстистої, огірків. У багатьох клітинах смородини виявлено хлоропласти з виростами та чашоподібними утвореннями.

При різних вірусних інфекціях спостерігається велика різноманітність мітохондрій за формою - подовжені, чашо-або булавоподібні тощо. Одночасно міняється й їхня внутрішня структура.

Встановлено, що в ядрах клітин, уражених шаркою сливи, а також хлоровом жилок і жовтою плямистістю малини, хроматин утворює великі, з'єднані між собою верністі грудочки, розміщені в різних зонах матрикса. У рослин смородини чорної, інфікованих вірусом безплідності, грудочки хроматина розміщуються за периметром ядерної оболонки.

У клітинах дерев сливи та вишні повстистої, уражених вірусом шарки, виявлено внутріядерні електронно щільні кристалічні включення. Однак у клітинах здорових рослин усі виявлені морфологічні зміни та включення були відсутні.

Проведені нами дослідження показали, що використовуючи комплекс методів детекції вірусів можна ідентифікувати патоген, який викликав певний характер зовнішніх аномалій у рослин. Досить чіткий та специфічний характер їх в уражених рослин, специфічна реакція рослин-індикаторів для вірусів, що передаються соком, дозволяє вже на підставі цих даних провести попередню ідентифікацію збудників (кільцеві плямистості кісточкових, зелена крапчастість смородини).

Специфічні зовнішні симптоми та внутріклітинні включення (структури Едвардсона) дають змогу ідентифікувати вірус шарки і на тих рослинах, які не описані як його природні хазяї. Такий тип включень відповідає певним вірусам або групам структурно споріднених вірусів і може бути використаний для діагностики патогена.

Якщо виявлено зовнішні аномалії у вигляді мозаїчностей, плямистостей, що можуть бути викликані багатьма патогенами та при

відсутності механічної передачі збудника доцільно використати метод електронної мікроскопії. Він дозволяє виявити в ураженій клітині структури, які відсутні в здоровій. За допомогою цього методу ми встановили два бациллоподібні віруси на смородині та малині, вивчили їх структуру і характер локалізації.

Метод електронної мікроскопії дозволив також виявити незвичайний вірус на малині досить великих розмірів, остаточна ідентифікація якого була одним із завдань наших подальших досліджень.

В ураженій клітині відмічено аморфні та кристалічні включення, що являють собою надлишковий матеріал, вироблений клітиною, який в результаті блокування багатьох метаболічних процесів відкладається у вигляді Ф-білка (флюемного білка).

В ураженій клітині виявлено цілу низку морфологічних і структурних змін клітинних органел. Такі зміни справляють інгібіуючу дію на всі фізіологічні процеси рослини, різко знижуючи їх продуктивність.

3. Добір безвірусних клонів для створення маточних насаджень

Для створення безвірусного маточного фонду кісточкових культур ми провели обстеження в насадженнях дослідних господарств (ДГ) "Новосілка" і "Дмитрівка" і відібрали високоврожайні вихідні дерева без зовнішніх ознак вірусних захворювань.

При попередній перевірці діагностику вірусів, які переносяться соком, проводили методами ІФА та біотесту на трав'янистих рослинах-індикаторах. Першим з двох названих методів вибракувано дерева, вражені вірусами кільцевих плямистостей. Віруси шарки сливи та хлоротичної плямистості листя яблуні в ДГ не виявлено.

Усі клони вільні від вірусів, за даними попередньої перевірки, були піддані основній.

На шести видах деревинних індикаторів (Бінг, Кванзан, Широфуген, дика черешня, вишня повстиста, Малус платікарпа) перевірено 13 сортів вишні, дев'ять з яких виявилися вільними від вірусів (табл. 3).

Короткий цикл експлуатації елітих маточних насаджень кущових ягідників (три-чотири роки), поновлення сортового складу зумовлюють щорічне включення в тестування, що триває два-три роки, нових вихідних кущів і на підставі реакції рослин-індикаторів проведення добору клонів, вільних від вірусів.

Таблиця 3 - Результати попереднього та основного тестування
вихідних дерев вишні на ураження вірусами
(1991 - 1992 рр.)

Сорт	Огірки	І Ф А			Широфу- ген	Дика черешня	Вишня повстиста	Бінг	Кванзан	Малос платікарпа
		ВНКП	ВХКП	ВХЦЛЯ						
Жуковська 11р50д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Новодворська 10р46д	+	+	+	-	+	+	-	+	-	
10р47д	+	+	-	-	+	+	-	+	-	
Біржольовська 4р11д	+	-	+	-	+	+	-	+	-	
Червоний прапор 15р28д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Гріот Серідко 17р19д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Альфа 7р27д	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Метеор 3р27д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Норд стар 7р23д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Подбельська 14р 7д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Рання 2 3р11д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Моканешти 7р39д	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
7р40д	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
7р34д	+	+	-	-	+	+	+	+	-	
Тургенівка 2р27д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Гріот остгеймський 1р12д	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примітка: + позитивний результат, - негативний результат, р - ряд, д - дерево.

У результаті перевірки вихідних маточних рослин кісточкових і ягідних культур на трав'янистих і деревинних рослинах-індикаторах, методом ІФА відібрано десять сортів вишні (Гріот Серідка, Гріот остгеймський, Гріот український, Метеор, Тургенівка, Норд стар, Альфа, Жуковська, Рання 2, Червоний прапор), чотири - черешні (Присадибна, Кизаївська чорна, Нектарна, Ніжність), два - сливи (Ренклюд Альтана, Угорка італійська), два - абрикоса (Поліський крупноплідний, Колгоспний), два - аличі (Комета, Абрикосовий аромат), 11 маточно-насіньних дерев дикої черешні, 19 сортів смородини чорної (Новість Прикарпаття, Черешнева, Чернеча, Сіянець Голубки, Загадка, Чорнобильська, Оджебін, Пілот Александр Мамкін, Сюїта Київська, Санюта, Мінай Шмирьов, Білоруська солодка, Фертоді чорна, Диво, Клусонівська, Поезія, Бінар, Пам'ять Вавілова, Купаленка), сім - порічки червоної (Рондом, Щедра, Рання солодка, Червона Віксне, Йонкер Ван Тетс, Голландська червона, Фертоді червона), чотири - малини (Новокитаївська, Новість Миколайчука, Новість Кув'яміна, Щедрівка).

ВИСНОВКИ

1. На підставі зовнішніх симптомів на рослинах-хазяях і рослинах-індикаторах при біотесті, а також результатів ІФА встановлено, що уражуваність кісточкових порід вірусами кільцевих плямистостей у різних зонах України коливається від 1,2 до 92,8 % залежно від культури та сорту.

2. Характер зовнішніх і внутріклітинних аномалій, а також дані ІФА дозволили зробити висновок про зараження сливи й персика в насадженнях Львівського філіалу ІС УААН і Придністровської ДСС вірусом шарки сливи. Хворі дерева становили понад 40 %.

3. Виявлено зараження малини кільцевою (10-100 %) і жовтою (2-64 %) плямистостями, жовтою сітчастістю (2-100 %); смородини чорної - зеленою крапчастістю (4-30,5 %) і махровістю (2-10 %).

4. Вивчення внутріклітинних аномалій вишні повстистої з симптомами лінійного візерунка, виявленими в маточно-насіньних насадженнях Донецького філіалу ІС УААН, дало змогу встановити зараження вірусом шарки сливи.

5. При дослідженні внутріклітинних аномалій листя і пелюсток смородини чорної з симптомами асиметричності листової пластинки

та безплідності вперше виявлено бацилоподібний вірус. Описано його структуру та характер локалізації в клітині (ядро й цитоплазма). Розмір часток у клітині - 250-285 x 65-85 нм, а в нативних препаратах - 280-330 x 50-65 нм.

6. При штучному зараженні 13 сортів смородини чорної та 9 - порічки червоної на третій рік після нього на всіх сортах виявлено симптоми асиметричності та хлоротичної крапчастості. Найчіткіше вони проявилися в сортів Оджебін, Мінай Шмирьов, Санюта, Сюїта Київська (чорна смородина) та Йонкер Ван Тето, Голландська червона (червона порічка). Лише у сорту Амос Влек розвинувся симптом безплідності - квітки мали вигляд лусочки, ягоди не формувалися. Зовсім були відсутні ознаки хвороб у сортів порічки червоної Фертоді червона, Щедра, Первісток.

7. При вивченні внутріклітинних аномалій малини з симптомами хлоротичної плямистості вздовж жилок виявлено бацилоподібні частки, які вільно розкидані по цитоплазмі або утворюють невеликі скупчення, оточені клітинними мембранами. Поперечний та поздовжній перетин часток свідчить про їх складну будову. Розмір їх - 460-490 x 70-90 нм, а в нативних препаратах - 400-430 x 75 нм.

8. За морфологічними ознаками, розміром часток і характером їх локалізації у клітині ідентифіковано вірус хлорову жилок малини (Raspberry vein chlorosis virus).

9. При штучному зараженні 17 сортів малини вірусом хлорову жилок малини найчіткіше симптоми проявилися на сортах Норфолк Джейнт і Новість Миколайчука.

10. Бацилоподібна форма часток, виявлених у клітинах чорної смородини, порічки та малини, їх розмір і складна будова (наявність зовнішньої мембрани) дозволили віднести описані нами віруси до групи рабдовірусів рослин.

11. Вивчення внутріклітинних аномалій листя малини з симптомами жовтої плямистості дозволило виявити великі поліедральні частки розміром 85-135 нм, локалізовані в цитоплазмі та перінуклеарному просторі. Як окремі частки, так і великі скупчення (до 100-120 часток) оточені одинарною мембраною, схожою на розширений ендоплазматичний ретикулум. Механічно збудник не передається. В ході дослідів за допомогою щеплення щитком з брунькою захворювання було передано на 10 сортів малини. Найчутливішими до нього виявилися сорти Ллойд Джордж і Мар'янушка. Аналогів патогену в літературних джерелах не знайдено.

12. Методом електронної мікроскопії виявлено морфологічні та структурні зміни клітинних органел уражених рослин, які негативно відбиваються на метаболізмі клітин і продуктивності рослин.

13. Зовнішні та внутріклітинні аномалії, виявлені нами при зараженні вірусами, використано для вибракування хворих рослин при створенні елітного фонду кісточкових і ягідних культур. За результатами тестування на рослинах-індикаторах, а також ІФА відібрано безвірусні клони та закладено маточні насадження. Маточний фонд включає: 10 сортів вишні, 4 - черешні, 2 - сливи, 2 - абрикоса, 2 - аличі, 11 маточно-насієних дерев дикої черешні, 19 сортів смородини чорної, 7 - порічки червоної, 4 - малини.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИМ УСТАНОВАМ З САДІВНИЦТВА
ТА ЕЛІТНИМ ПЛОДОРΟΣАДНИЦЬКИМ ГОСПОДАРСТВАМ

При тестуванні вихідних кущів смородини чорної на вірус безплідності доцільно використовувати як індикатор сорт Амос Влек. Він проявляє симптом безплідності на третій рік після зараження.

У процесі діагностики цієї хвороби методом електронної мікроскопії на смородині чорній та порічці червоній пролонгується використовувати тканини пелюсток квітки, вміщуючи їх у краплю 2 % ФБК (фосфорно-вольфрамової кислоти) рН 7,0 з попередньою фіксацією в 6,5 % глутаральдегіді на форфатному буфері рН 7,0.

Для діагностики вірусу шарки рекомендується використовувати як індикатор клонову підщепу ВСВ-1 і вишню повстисту. Перша розвиває чіткий лінійний візерунок на листі через 11 місяців, друга - кільцевий візерунок на плодах на другий рік після зараження.

СПИСОК ПРАЦЬ
ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Таранухо Н.П., Глушак Л.Е. Внутриклеточные аномалии растений как диагностические признаки при вирусной и микоплазменной инфекции // Проблемы современного садоводства: Тез. докл. - К., 1989. - Ч.2. - С. 92.

2. Таранухо Н.П. Бациллоподобные вирусоподобные частицы в черной смородине // Проблемы интенсификации современного садоводства:

Тез. докл. - Мичуринск, 1990. - С. 201-202.

3. Глушак Л.Ю., Таранухо М.П., Супрун К.І. Вірус шарки сливи в Україні // Тези доповідей і виступів науково-практичної конференції присвяченої 25-річчю від дня утворення Краснокутської дослідної станції садівництва, 1993. - С. 108-109.

4. Глушак Л.Е., Таранухо Н.П. Диагностика вируса шарки сливы // Микробиол. журн. - 1995, - 57, N 2. - С. 61-65.

5. Таранухо Н.П., Глушак Л.Е. Рабдовирусы смородины черной и малины // Микробиол. журн. - 1995. - 57, N 5. - С. 44-52.

6. Boyko A.L., Spaar D., Polishchuk V.P., Senchugova N.A., Mishenko L.T., Silayeva A.M., Glushak L.E., Taranukho N.P. The exploration of rhabdoviruses infecting agricultural plants in conditions of the Ukraine // Arch. Phytopath. Pflanz. - 1996. - Vol. 30. - P. 85-90.

7. Кирик М.М., Глушак Л.Ю., Таранухо М.П., Сидоренко П.А. Створення безвірусного фонду кісточкових культур // Вісник аграрної науки. - 1996. - N 6. - С. 13-16.

АННОТАЦІЯ

Таранухо Н.П. Внешние и внутриклеточные аномалии растений - диагностические признаки вирусных заболеваний косточковых и ягодных культур при отборе безвирусных клонов.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.21 - фитопатология.

Национальный аграрный университет, Киев, 1996.

Защищается кандидатская диссертация, в которой представлены результаты исследования внешних и внутриклеточных аномалий растений косточковых и ягодных культур как диагностических признаков вирусных заболеваний.

Показано, что применение комплекса диагностических методов (ИФА, биотест, электронная микроскопия) позволяет надёжно выявить вирусные заболевания косточковых и ягодных культур при отборе безвирусных клонов для создания маточных насаждений.

Установлено естественное заражение вишни войлочной вирусом шарки сливы, которая в литературе описана как его экспериментальный хозяин.

При использовании электронно-микроскопического метода анализа впервые на растениях смородины чёрной с симптомами бесплодности выявлен бациллоидный вирус, локализованный в ядре, перинуклеарной

зоне и цитоплазме. Размер частиц *in situ* - 250-285 x 65-85 нм.

В тканях растений малины с симптомами хлоротической пятнистости вдоль жилок листа также выявлен бациллоидный вирус, локализованный в цитоплазме. Размер частиц *in situ* - 460-490 x 70-90 нм. Он идентичен описанному за рубежом вирусу хлороза жилок малины.

В этой же культуре отмечен крупный полиэдральный вирус, локализованный в перинуклеарной зоне и цитоплазме. Размер частиц *in situ* - 85-135 нм

Summary

Taranukho N. P. Outward and intercellular anomalies of plants are the diagnostical symptoms of virus diseases of stone fruit and berry crops used when selecting virus-free clones.

The dissertation is for getting a degree of the candidate of biological sciences in the speciality 03.00.21 - phytopathology.

National Agrarian University, Kyiv, 1996.

The thesis is defended which presents the results of investigating the outward and intercellular anomalies of stone fruit and berry plants as the diagnostical symptoms of virus diseases.

The usage of the complex of the diagnostical methods (ELISA, the biological test, the electronic microscopy) makes it possible to reveal virus diseases of stone fruit and berry crops when selecting the virus-free clones for womb plantations. We detected the natural infection of the Manchú cherry with the plum pox virus described as its experimental host.

It is for the first time that we have succeeded in revealing a bacilliform virus located in the nucleus, perinuclear zone and cytoplasm of black currants plants with fertility symptoms. Electron-microscopic methods of analysis were used for this purpose. Size of particles *in situ* is 250-285 x 65-85 nm.

A bacilliform virus located in the cytoplasm has been also revealed in tissues of raspberries with symptoms of chlorotic spots along the leaf veins. Size of particles *in situ* is 460-490 x 70-90 nm, is identical to the raspberries vein chlorosis virus described in foreign literature. The great polyhedral virus is revealed in the plants of raspberry. It is localised in the perinuclear zone and cytoplasm. The size of the particles *in situ* is 85-135 nm.

Ключові слова: вишня, черешня, слива, смородина, малина, вірус кільцевої плямистості кісточкових, шарка сливи, рабдовируси, діагностика, ядро, цитоплазма, ультратонкі зрізи,

4.3.4.0010

AB 36.002
AB 36.002