

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ТРЯПЩИНА НАТАЛІЯ ВАСИЛІВНА

УДК 636.2/4:636.082.2:575.827

**БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ ОТРИМАННЯ САДИВНОГО
МАТЕРІАЛУ КІСТОЧКОВИХ (*PRUNUS* SPP.) ТА ЯГІДНИХ (*RIBES* SPP.,
RUBUS SPP., *FRAGARIA* X *ANANASSA*) КУЛЬТУР В УКРАЇНІ**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора сільськогосподарських наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті садівництва Національної академії аграрних наук України

Науковий консультант доктор сільськогосподарських наук, професор
Бублик Микола Олександрович,
Інститут садівництва НААН,
перший заступник директора

Офіційні опоненти: доктор сільськогосподарських наук, професор
Теслюк Віктор Васильович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
завідувач кафедри сільськогосподарських
машин та системотехніки ім. акад. П. М. Василенка

доктор біологічних наук, професор, академік НААН
Бойко Анатолій Леонідович,
Інститут агроекології і природокористування НААН,
головний науковий співробітник
лабораторії екології вірусів та біобезпеки

доктор сільськогосподарських наук,
старший науковий співробітник
Мулюкіна Ніна Анатоліївна,
Національний науковий центр
«Інститут виноградарства та виноробства
ім. В. Є. Таїрова» НААН,
заступник директора з наукової роботи

Захист відбудеться «06» жовтня 2016 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.15 у Національному університеті біоресурсів і природо-користування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Генерала Родимцева, 19, навчальний корпус № 1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розісланий «05» вересня 2016 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Ю. В. Коломієць

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Використання високоякісного сертифікованого садивного матеріалу плодкових та ягідних культур, вільного від вірусних патогенів, є ключовим елементом інтенсифікації галузі садівництва. Його масове вирощування можливе лише за впровадження сучасних наукових розробок з тестування рослинного матеріалу на наявність вірусних патогенів, оздоровлення, прискореного розмноження та попередження реінфікування вірусами на всіх етапах виробництва (Гриник І. В., 2013; Кондратенко П. В., 2010; Gergerich et al., 2015). Адаптація схем сертифікації кісточкових та ягідних культур до умов України та розроблення і вдосконалення біотехнологій, що їх забезпечують, є актуальним питанням для її агропромислового комплексу, оскільки гарантує раціональне використання природних та матеріальних ресурсів, сприяє практичному запровадженню програми вирощування сертифікованого садивного матеріалу та відповідає доктрині екологізації сучасного сільськогосподарського виробництва (European Commission, 2013).

Віруси у структурі захворювань садових культур, що спричинені фітопатогенами, посідають провідне місце, випереджаючи грибні та бактеріальні хвороби за поширенням (Jones&Barbetti, 2012; Jones, 2014). Їхній вплив на плодіві та ягідні культури найвищий порівняно з іншими сільськогосподарськими культурами, оскільки технології утримання насаджень цих культур є інтенсивнішими, з більшими капіталовкладеннями та продуктивністю на гектар (Anderson et al., 2004).

Під час виробництва садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур реінфекція може відбуватись не тільки механічним шляхом, але й завдяки природним процесам перенесення вірусів. Наявність різних способів трансмісії (вектори, ґрунт, пилок, насіння) та типів циркуляції вірусів, пов'язаних з природно-кліматичними особливостями, забезпечує існування різноманітних паразитарних систем, у тому числі змішаних інфекцій за участі багатьох вірусів, які мають безпосередній та опосередкований вплив на фітовірусологічний стан садивного матеріалу під час його виробництва та сертифікації (Бойко та ін., 2012; Roossinck, 2015; Dixon et al. 2012; Chakraborty et al. 2011; Eastburn et al. 2011).

У сучасних умовах постає необхідність розроблення якісно нових технологій оздоровлення та захисту від вірусних інфекцій на всіх етапах виробництва сертифікованого садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур відповідно до схем сертифікації, які враховують природно-кліматичні особливості України, сортовий склад культур, характеристики взаємовідносин між вірусом та господарем, природні шляхи перенесення вірусів тощо.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження виконано у відповідності до тематичного плану науково-дослідних робіт Інституту садівництва НААН (ІС НААН) на 2001–2010 рр. за державною програмою «Створити базу вихідного садивного матеріалу плодкових і ягідних культур вільних від шкодочинної інфекції за технологіями, що відповідають міжнародним вимогам» (номер державної реєстрації 0104U004117), упродовж

2011–2015 рр. згідно з державними програмами «Розробити наукові основи виробництва здорового садивного матеріалу та генетичного контролю господарсько-цінних ознак плодових, ягідних та декоративних культур» (номер державної реєстрації 0711U003176) та «Вдосконалити методи цілеспрямованого і прискореного створення нових високопродуктивних сортів плодових і ягідних культур, адаптованих до умов вирощування та сучасних технологій» (номер державної реєстрації 0104U004106), за науково-технічною програмою НААН «Сільськогосподарська біотехнологія 2006–2010 рр.», Підпрограмою 1 «Розробити біотехнології створення нових генотипів в рослинництві та генетичного контролю кількісних та якісних ознак» за завданням 02.13 «Розробити наукові основи використання біотехнологічних методів виробництва безвірусного садивного матеріалу плодових і ягідних культур» (номер державної реєстрації 0104U004106), за науково-технічною програмою НААН «Сільськогосподарська біотехнологія – 2011–2015 рр. Розвиток сучасних біотехнологій і підвищення ефективності методів поліпшення рослин, тварин і мікроорганізмів» Підпрограма 1 «Поліпшення генотипів рослин з використанням досягнень сучасної біотехнології (номер державної реєстрації 0104U004106), за двостороннім міжнародним проектом «Advanced development of plum pox virus diagnostics through survey, characterization, and preservation of PPV-W sub-group isolates, or other unusual sub-group isolates, in Germplasm and field samples from the Ukraine», USDA, APHIS, PPQ, National Plant Germplasm and Biotechnology Laboratory, Center for Plant Health Science and Technology (CPHST), Beltsville (номер реєстрації PV PROJ 1513630001, 2009–2012 рр.).

Мета та задачі дослідження. Мета роботи – розроблення теоретичних і методичних основ ресурсозберігаючої біотехнології розмноження та сертифікації садивного матеріалу кісточкових і ягідних культур, адаптованої до їх породно-сортового складу та природно-кліматичних умов України.

Для досягнення мети було поставлено такі задачі:

1. Проаналізувати ефективність проведення стандартних етапів схем сертифікації кісточкових та ягідних культур при переведенні садівництва України на вирощування сертифікованого садивного матеріалу.

2. Оцінити вплив природних шляхів перенесення вірусів кісточкових та ягідних культур на ефективність проведення консерваційного етапу схем сертифікації.

3. Удосконалити систему скринінгових лабораторних тестів для виявлення вітчизняних ізолятів найбільш поширених вірусів.

4. Розробити підходи до універсалізації біотехнологій оздоровлення сортів і підщеп кісточкових та ягідних культур з мінімізацією стресового навантаження на рослину та запобіганням небажаним впливам на її генетичну стабільність.

5. Створити цілісну систему оцінювання якості оздоровлення садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур методами хемотерапії в культурі *in vitro*.

6. Підібрати високополіморфні системи генетичного маркування для оцінювання генетичної ідентичності рослин сортів і підщеп кісточкових та ягідних культур.

7. Вивчити різноманіття вірусних змішаних інфекцій кісточкових та ягідних культур та типів біологічної взаємодії в них між вірусами.

8. Охарактеризувати епідеміологічну поведінку вірусу шарки сливи у вітчизняних насадженнях кісточкових культур.

9. Дослідити стратегії поширення вірусів, розробити математичні моделі з їх опису, та теоретично обґрунтувати методи їх контролю.

10. Оцінити економічну доцільність запровадження схем сертифікації кісточкових та ягідних культур у садівництві України.

11. Запропонувати цілісну концепцію запобігання реінфікуванню вірусами здорового садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур під час вирощування та максимального збереження цього статусу у рослин упродовж їх експлуатації в плодоносних насадженнях.

Об'єкт дослідження – біотехнології вирощування сертифікованого садивного матеріалу, схеми сертифікації кісточкових і ягідних культур в умовах України.

Предмет дослідження – сорти кісточкових і ягідних культур, віруси, що їх уражають, способи контролю поширення вірусних інфекцій.

Методи дослідження. Для виконання поставлених задач використано експериментальні методи: біотехнологічні (культивування *in vitro*); серологічні (твердофазний ІФА); молекулярно-генетичні (виділення ДНК та РНК, полімеразна ланцюгова реакція у модифікаціях ЗТ-ПЛР, IRAP-ПЛР, iPBS-ПЛР, горизонтальний агарозний гель-електрофорез, вертикальний поліакриламідний гель-електрофорез, пряме сиквенування, векторне сиквенування); біоінформатичні (редагування хроматограм, вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей, філогенетичний аналіз з використанням програмних продуктів Blast, MEGA 5). На теоретичному рівні застосовано методи математичного моделювання та доказової епідеміології. Описово-узагальнюючі методи використано для досліджень візуальної симптоматики вірусних захворювань рослин у польових і культуральних умовах та фітотоксичного ефекту віроцидів на експлантатах. Достовірність отриманих результатів підтверджували методами параметричної і непараметричної статистики із застосуванням програм MiniTab, EXCEL, JawaStat, Wineperi.

Наукова новизна одержаних результатів. Автором *вперше* в Україні:

– обґрунтовано та розроблено теоретичні та методологічні засади переведення садівництва України на вирощування сертифікованого садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур;

– запропоновано шляхи підвищення ефективності консерваційного етапу схем сертифікації шести кісточкових та шести ягідних культур;

– доведено успішність тактики селективності для поширення універсальних вірусів, створено математичну модель для обчислення коефіцієнта селективності, як елементу обліку під час сортовипробування;

- розроблено методологічний алгоритм оцінювання якості садивного матеріалу в процесі його оздоровлення методом хемотерапії;

- апроксимовано динаміку зниження концентрації капсидного вірусного білка шести рослинних вірусів в експлантатах кісточкових та ягідних культур під впливом саліцилової кислоти (СК), рибавіріну та аміксину за моно- та мультівірусного інфікування рослин до математичних функцій;

- з'ясовано основні принципи універсалізації схем хемотерапії для оздоровлення експлантатів в культурі *in vitro* від моно- та мультівірусних інфекцій;

- доведено, що культивування інфікованих експлантатів *in vitro* в комплексі з хемотерапією може сприяти добору більш вірулентних вірусних популяцій, виявлено залежність цих процесів від дози антивірусних препаратів і композиції фітогормонів у живильному середовищі;

- показано відсутність дестабілізуючого впливу рибавіріну та СК на N-кінець гена капсидного білка вітчизняних ізолятів ВШС штаму Дідерон, який є визначальним для штамової належності вірусу;

- запропоновано теоретично обґрунтовану комплексну систему оцінок базових ризиків і прогнозних оцінок розвитку фітовірусологічної ситуації та окреслено основні фітовірусологічні ризики в насадженнях кісточкових та ягідних порід, пов'язані зі змінами клімату;

- створено математичну модель з оцінки рівня тяжіння вірусів до асоціації з іншими вірусами, або до моновірусного інфікування при поширенні та доведено існування популяційних компенсаторних механізмів у насадженнях персика та аличі, які полягають у вибірковому накопиченні вторинного вірусного інокулюму переважно у хворих вірус-інфікованих дерев, що лімітує розповсюдження вторинних і третинних вірусних інфекцій в обмеженому колі рослин;

- визначено кісточкові культури найменшого та найбільшого епідеміологічного ризику для поширення ВШС;

- оцінено економічну ефективність запровадження схем сертифікації з вирощування садивного матеріалу плодових та ягідних порід в Україні.

Удосконалено:

- панелі цільових вірусних патогенів у системах сертифікації садивного матеріалу вишні та черешні;

- систему оцінювання адаптивного потенціалу сортів під час сортовипробування з акцентом на рівень атрактивності сорту для колонізації вірусними патогенами;

- скринінгове тестування методом твердофазного ІФА вітчизняних ізолятів вірусів некротичної кільцевої плямистості та шарки сливи;

Набули подальшого розвитку наукові положення щодо:

- універсальності антивірусної дії СК та її стимулюючого впливу на життєздатність експлантатів;

- універсальності антивірусної та специфічності токсичної дії рибавіріну;

- найінформативніших молекулярно-генетичних маркерів для оцінювання соматональної мінливості;

– природи соматклональної мінливості, яка пов'язана з активністю мініатюрних ретротранспозонів у транскрипційно активних ділянках геному рослин.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено науково-обґрунтовані складові біотехнологій отримання сертифікованого садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур в Україні.

Виділено рослини-кандидати в материнські рослини та створено загальний фонд добазових колекцій, що налічує 165 сортів шести кісточкових та 54 сорти шести ягідних культур. Розроблено систему оцінювання якісних і кількісних показників ефективності хемотерапії вірус-інфікованих експлантатів з використанням напівкількісного ІФА. Запропоновано універсальні модулі хемотерапевтичного оздоровлення: «каскадний» – для антивірусних препаратів з вираженим пролонгованим терапевтичним ефектом, імпульсний – для препаратів з короткотривалою антивірусною дією. Розроблено методику до- та постхемотерапевтичної обробки експлантатів малини СК для підвищення їх життєздатності та оптимізації адаптації до умов *in vivo*. Підібрано ефективні маркерні системи для контролю генетичної ідентичності рослин кісточкових та ягідних порід на різних етапах мікроклонування та хемотерапії. Обґрунтовано та розроблено прецизійні для кожної кісточкової культури стратегії превентивних заходів щодо обмеження поширення ВШС.

Практичні результати роботи підтверджено відповідними актами впровадження, рекомендаціями, технологіями виробництва, використано під час розроблення нормативних документів: ДСТУ 7185:2010 «Культури плодові та ягідні. Методи визначення фітовірусологічного статусу садивного матеріалу кущових ягідних культур»; ДСТУ 7186:2010 «Культури плодові та ягідні. Методи визначення фітовірусологічного статусу садивного матеріалу суниці»; ДСТУ 7184:2010 «Культури плодові та ягідні. Методи оздоровлення садивного матеріалу від вірусних та вірусоподібних інфекцій»; ДСТУ 8330:2015 «Культури плодові та ягідні. Методи виявлення вірусу шарки сливи».

Отримані експериментальні дані щодо оптимізації етапів схем сертифікації кісточкових та ягідних культур в Україні використовують студенти Національного університету біоресурсів і природокористування України з курсу «Прогресивні технології в розсадництві» зі спеціальності «Плодоовочівництво і виноградарство».

Особистий внесок здобувача. Нові теоретичні та експериментальні ідеї в дисертаційній роботі, постановка проблеми, розроблення програм досліджень, узагальнення результатів і формулювання висновків належать автору. Накопичення первинних матеріалів, тестування рослинного матеріалу лабораторними методами, розроблення системи прогнозних оцінок і математичних моделей, аналіз і статистична обробка отриманих даних проведено особисто автором. Відбір зразків та візуальні обстеження насаджень проведено разом із співробітниками відділу вірусології, оздоровлення та розмноження плодових і ягідних культур і дослідних установ системи ІС НААН. Культивування *in vitro* рослин кісточкових та ягідних культур виконано старшим науковим співробітником відділу вірусології, оздоровлення та

розмноження плодових і ягідних культур ІС НААН кандидатом біологічних наук Т. В. Медведєвою.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи викладено і обговорено на вчених радах Інституту садівництва НААН у 2004–2015 рр., координаційно-методичних нарадах з сільськогосподарської біотехнології в Південному біотехнологічному Центрі в рослинництві в 2004–2012 рр. та в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннізнавства та сортовивчення НААН у 2013–2015 рр., а також на вітчизняних, і зарубіжних конференціях і з'їздах: IV Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (м. Київ, 2004 р.); Xth International Plant Virus Epidemiology Symposium «Controlling epidemics of emerging and established plant virus diseases – the way forward», (м. Хайдарабад, Республіка Індія, 2007 р.); V Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (м. Київ, 2007 р.); Международной научно-практической конференции «Интегрированная защита садов и виноградников» (м. Одеса, 2008 р.); Международной конференции «Информационные системы диагностики, мониторинга и прогноза важнейших сорных растений, вредителей и болезней сельскохозяйственных культур» (м. Санкт-Петербург, Російська Федерація, 2008 р.); XII з'їзді товариства мікробіологів України ім. С. М. Вернадського (м. Ужгород, 2009 р.); III Міжнародній науково-практичній конференції «Екотрофологія, аспекти продовольчої та харчової безпеки» (м. Біла Церква, 2009 р.); Міжнародній науковій конференції «Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках» (м. Київ, 2010 р.); VI Міжнародній конференції «Біоресурси та віруси» (м. Київ, 2010 р.); Міжнародній науковій конференції «Молодь і поступ біології» (м. Львів, 2010 р.); Всеукраїнській конференції «Фітосанітарна безпека та біоекологія застосування пестицидів» (м. Чернівці, 2010 р.); VI Міжнародній конференції: «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Алушта 2010 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічна безпека сільськогосподарського виробництва» (м. Київ, 2010 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека» (м. Одеса, 2010 р.); VII науковій конференції «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (м. Чернігів, 2010 р.); VII Міжнародній конференції: «Фактори експериментальної еволюції організмів» (м. Алушта 2011 р.); Международной научной конференции «Современная биология растений» (м. Луганськ, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічна безпека сільськогосподарського виробництва» (м. Київ, 2011 р.); Всеукраїнській науковій конференції, присвяченій пам'яті Л. П. Симиренка (м. Київ, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні досягнення садівництва» (м. Київ, 2012 р.); VIII науковій конференції «Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві» (м. Чернігів, 2012 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічна безпека та збалансоване природокористування в агропромисловому виробництві» (м. Київ, 2012 р.); Першій міжнародній науково-практичній конференції «Стан і перспективи формування сортових рослинних ресурсів в Україні» (м. Київ,

2012 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Теорія і практика технологій вирощування та оздоровлення насіння і садивного матеріалу, конкурентоздатних в умовах європейського ринку» (м. Київ, 2012 р.); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы агропромышленного производства» (м. Курськ, Російська Федерація, 2013 р.); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы защиты садовых культур от вредных организмов» (м. Москва, Російська Федерація, 2013 р.); Международном симпозиуме «Защита растений: достижения и перспективы» (м. Кишинів, Республіка Молдова, 2015 р.).

Публікації. Результати досліджень за темою дисертації опубліковано в 61 науковій праці, з яких 25 статей у наукових фахових виданнях України, стаття у науковому фаховому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних, 4 статті у наукових виданнях інших держав, 7 статей в інших виданнях, 18 тез наукових доповідей, 3 Національні стандарти, 3 методичні рекомендації.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 390 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 4 експериментальних розділів, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаної літератури та 4 додатків. Основний текст містить 85 таблиць та 51 рисунок. Список цитованої літератури включає 591 джерело (з них 543 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ (Огляд літератури)

Узагальнено міжнародний досвід з практичного запровадження систем сертифікації плодових та ягідних культур і виділено основні напрями наукових досліджень, які є критичними для забезпечення всіх етапів виробництва високоякісного садивного матеріалу. Показано, що розвиток інноваційних біотехнологій у цій галузі залежить від знань про біологічні, генетичні та епідеміологічні характеристики вірусних патогенів. Виділено основні тенденції та найперспективніші наукові напрями за темою дисертації.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Загальну схему досліджень представлено на рисунку 1, обсяг проведених досліджень – у таблиці 1, перелік вірусних патогенів – у таблиці 2.

Відбір зразків проводили в колекційних, маточних, випробувальних і плодових насадженнях Інституту садівництва НААН (с. Новосілки, Київська область), Інституту помології ім. Л. П. Симиценка (сміт Мліїв, Черкаська область), Мелітопольської дослідної станції садівництва ім. М. Ф. Сидоренка ІС НААН (м. Мелітополь, Запорізька область), Артемівської дослідної станції розсадництва ІС НААН (с. Опитне, Донецька область), Подільської дослідної станції садівництва ІС НААН (с. Ведмеже Вушко, Вінницька область), Краснокутського науково-дослідного центру садівництва ІС НААН (м. Красний Кут, Харківська область), ЗАТ «Кримська фруктова компанія» (с. Петрівка,

Автономна Республіка Крим). Застосовано простий випадковий, систематичний та рендомізований пошаровий метод відбору.



Рис.1. Схема досліджень

Таблиця 1

**Загальна кількість протестованого рослинного матеріалу
кісточкових та ягідних культур**

Культура	Кількість зразків, (шт.)	Кількість тестувань, (шт.)	Культура	Кількість зразків, (шт.)	Кількість тестувань, (шт.)
Кісточкові культури			Ягідні культури		
Абрикос	391	1900	Агрус	90	450
Алича	252	1260	Малина	305	1830
Вишня	423	2100	Ожина	140	840
Персик	278	1390	Порічки	55	275
Слива	469	1870	Суниця	230	1380
Черешня	646	3230	Смородина	280	1400
Експлантати та адаптовані рослини					
Агрус	220	1100	Підщепа Гізела 6	103	620
Малина	262	8920	Слива	112	650

Детекцію вірусів у рослинному матеріалі проводили методом твердофазного імуоферментного методу з використанням поліклональних сертифікованих тестових систем виробництва Loewe Phytodiagnosics (Німеччина), Bioreba (Швейцарія), Agdia (США) згідно протоколів виробників.

Ідентифікацію ВШС проводили методом ЗТ-ПЛІР зі стандартними праймерами P1P2 з подальшим прямим сиквенуванням продуктів ампліфікації. Екстракцію РНК зі зразків проводили за допомогою комерційного набору MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentr an illumina company, США) згідно з рекомендаціями виробника. Для ЗТ-ПЛІР використовували систему The SuperScript® III One-Step RT-PCR System with

Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogene) у відповідності до інструкції виробника. Для оцінювання змін концентрації вірусного капсидного білка на різних етапах хемотерапії та мікроклонування застосовано напівкількісний ІФА (Polac et al., 2009). Для виділення тестованих на віруси базових клонів діагностику проводили у відповідності до ДСТУ7185:2010, ДСТУ7186:2010 та стандартів ЄОЗР РМ 4/29 та РМ 4/30.

Таблиця 2

Перелік вірусних патогенів кісточкових та ягідних культур

Українська назва	Англійська назва	Родина	Рід
Вірус карликовості сливи (ВКС)	<i>Prune dwarf virus (PDV)</i>	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ilarvirus</i>
Вірус кільцевої плямистості малини (ВКПМ)	<i>Raspberry ringspot virus (RRSV)</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
Вірус кільцевої плямистості томатів (ВКПТ)	<i>Tomato ring spot virus (ToRSV)</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
Вірус куцистої карликовості малини (ВККМ)	<i>Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)</i>	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ideovirus</i>
Вірус латентної кільцевої плямистості суниці (ВЛКПС)	<i>Strawberry latent ringspot virus (SLRV)</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Sadwavirus</i>
Вірус мозаїки резухи (ВМР)	<i>Arabis mosaic virus (ArMV)</i>	<i>Secoviridae</i> ,	<i>Nepovirus</i>
Вірус мозаїки яблуні (ВМЯ)	<i>Apple mosaic virus (AMV)</i>	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ilarvirus</i>
Вірус некротичної кільцевої плямистості (ВНКП)	<i>Prunus necrotic ring spot virus (PNRSV)</i>	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ideovirus</i>
Вірус скручування листя черешні (ВСЛЧ)	<i>Cherry leaf roll virus (CLRV)</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
Вірус чорної кільчастості томатів (ВЧКТ)	<i>Tomato black ring nepovirus (TBRV)</i>	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
Вірус хлоротичної плямистості листя яблуні (ВХПЛЯ)	<i>Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)</i>	<i>Betaflexi-viridae</i>	<i>Trichovirus</i>
Вірус шарки сливи (ВШС)	<i>Plum pox virus (PPV)</i>	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>

Для оцінювання генетичної ідентичності садивного матеріалу використовували ІРАР-ПЛР з праймерами до довгих кінцевих повторів і сайту зв'язування транскриптази мініатюрних транспозонів *Malus TRIM*. Виділення геномної ДНК проводили з використанням ЦТАБ. Розділення продуктів ампліфікації здійснювали у горизонтальному 1,5 % агарозному та вертикальному 10 % поліакриламідному гелі.

Редагування хроматограм після сиквенування, вирівнювання нуклеотидних послідовностей за алгоритмом ClustalWZ та їх подальший філогенетичний аналіз проводили з використанням пакету програм MEGA v.5.0. Вирівнювання нуклеотидних та амінокислотних послідовностей здійснювали за допомогою програмних продуктів Blast.

Ініціювання культури *in vitro* сливи, підщепи Гізела 6, агрусу та малини проведено з використанням верхівкових і пазушних бруньок. Як

стерилізувальний агент використовували сулему (0,1 % HgCl_2) і 70 % етанол. Експозиція стерилізації становила 1–3 хв. На етапі внесення в культуру та проліферації для сливи, малини та підщепи Гізела 6 застосовували модифіковане живильне середовище Мурасіге-Скуга з додаванням вітамінів і фітогормонів, рН = 5,5–5,7, для агрусу – середовище Лі і де Фоссарда. Експлантати культивували упродовж 16-годинного світлового дня з освітленням 2000–2500 лк за температури 23–25 °С і вологості повітря 50–60 %. Інфіковані лінії розмножених пагонів використовували як вихідний матеріал для хемотерапії *in vitro*. Тривалість пасажу становила 30 діб. На кожен варіант використано по десять мікропагонів. Для оздоровлення від вірусів використано саліцилову кислоту (СК) (10 мг/л, 15, 20, 40, 70 мг/л), рибавірин (віразол) (5 мг/л, 10, 50, 100 мг/л) та препарат Аміксин® ІС (100 мг/л, 150 і 200 мг/л) (ОАО ІнтерХім, Одеса). Віроциди вносили у середовище після стерилізації через мембранний фільтр ($d = 0,22 \mu\text{m}$). Для статистичного опрацювання отриманих даних у роботі використано параметричну та непараметричну статистику та програми MiniTab, EXEL, JawaStat, Winерері.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ОПТИМІЗАЦІЯ КОНСЕРВАЦІЙНОГО ЕТАПУ СХЕМ СЕРТИФІКАЦІЇ КІСТОЧКОВИХ ТА ЯГІДНИХ КУЛЬТУР В УКРАЇНІ

Створення добазових колекцій кісточкових та ягідних культур. Першим біотехнологічним етапом сертифікаційної схеми будь-якої плодової чи ягідної культури є відбір рослин-кандидатів у материнські рослини для створення добазових колекцій (табл. 3).

Таблиця 3

Узагальнені дані щодо виділення рослин-кандидатів у материнські рослини кісточкових та ягідних культур

Культура	Кількість сортів в Реєстрі	Зареєстровані сорти		Незареєстровані сорти		Загальна ефективність етапу, (%)
		к-кість перевірених, (шт.)	виділено рослин на сорт, (шт.)	к-кість перевірених, (шт.)	виділено рослин на сорт, (шт.)	
Вишня	16	10	4,47	27	3,21	57,4
Черешня	70	34	5,25	23	4,73	52,9
Абрикос	23	7	4,43	26	3,36	36,4
Персик	70	24	2,69	17	3,2	37,8
Алича	9	4	4,34	11	6,41	59,8
Слива	16	10	3,3	15	4,73	45,7
Смородина	26	15	4,17	19	3,38	38,7
Порічки	11	8	1,83	6	2,33	33,3
Малина	21	7	1,25	29	1,63	8,1
Суниця	38	17	3,67	29	2,14	48,5
Агрис	15	7	2,2	6	1,5	29,2

Складність виділення рослин кожного сорту прямо залежить від його чутливості до вірусних інфекцій та технологій утримання колекційних і селекційних насаджень, які сьогодні в Україні є основним джерелом рослинного матеріалу для виділення материнських рослин, а також від дискримінаційних можливостей лабораторних методів тестування рослинного матеріалу. Запровадження цього етапу сертифікаційних схем кісточкових та ягідних культур свідчить про обмежені можливості виділення чистих рослин всіх порід. За підсумком етапу створено колекцію добазових клонів тестованих на віруси рослин для 165 сортів кісточкових та 54 ягідних культур. Ефективність етапу, яка визначається відношенням виділених рослин до перевірених, становить для кісточкових культур 50 %, ягідних – 30 %.

Специфічність складу вірусних інфекцій у насадженнях кісточкових та ягідних культур в Україні. За даними перевірки статусу рослинного матеріалу кісточкових та ягідних культур під час створення добазових колекцій було з'ясовано, що найбільш поширеними вірусами є ті, що можуть інфікувати нову рослину під час запилення. Для кісточкових культур це ВНКП, для ягідних – ВКПМ та ВЛКПС, для малини – ВККМ (рис. 2, 3).

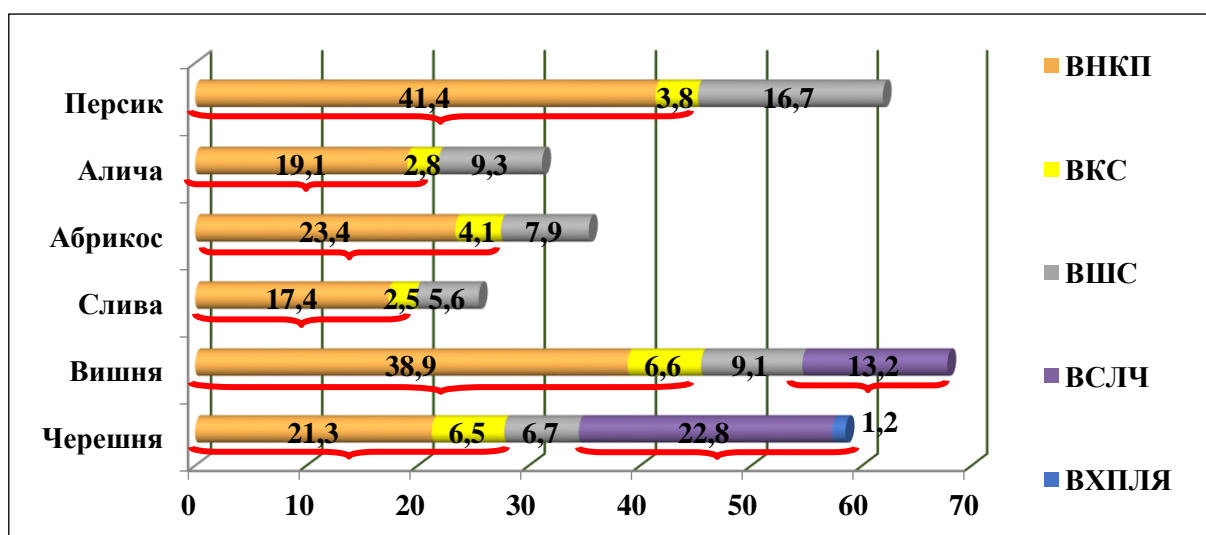


Рис. 2. Кількісний склад вірусів, виявлених у протестованому матеріалі кісточкових культур, % (парантези – поширення вірусів, що передаються з пилом під час запилення)

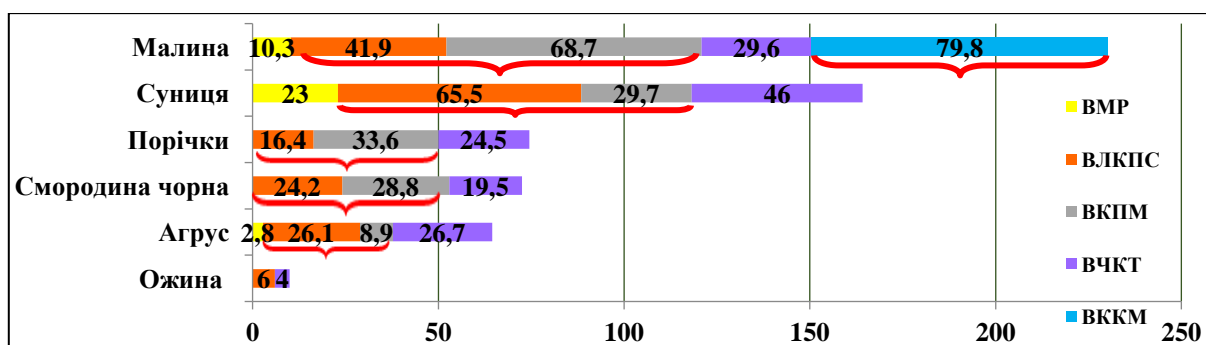


Рис. 3. Кількісний склад вірусів, виявлених у протестованому матеріалі ягідних культур, % (парантези – поширення вірусів, що передаються з пилом під час запилення)

Удосконалення сортовипробування як перспектива підвищення ефективності відбору добазових клонів. Доцільність оцінювання сортів на додаткові ризики інфікування вірусними інфекціями, що переносяться під час запилення та через векторні організми, продемонстровано у досліді з вивчення насаджень кісточкових культур у зоні Південного Степу. Для цього у випробувальних насадженнях абрикоса, вишні, черешні та персика різного віку відібрано зразки пошаровим рендомізованим методом. Сорти згрупували у дві групи: 1 – раннього та надраннього, 2 – середнього і пізнього термінів дозрівання. Для оцінювання додаткового популяційного ризику інфікування вірусом залежно від віку насадження (А) та строку дозрівання (В) сортів застосували метод Бейєса у модифікації (Rothman, 2002; Knol et al., 2007). Показники ризику інфікованості обчислили для чотирьох категорій: молоді сади із середнім і пізнім термінами досягання – позначення «А-В+», молоді насадження з надраннім і раннім строками – позначення «А-В-», старі сади з середнім і пізнім термінами – позначення «А+В+», старі насадження з надраннім і раннім строками – «А+В». У всіх проаналізованих випадках порівняння насаджень різниця між їх віком становила 3–4 роки (рис. 4).

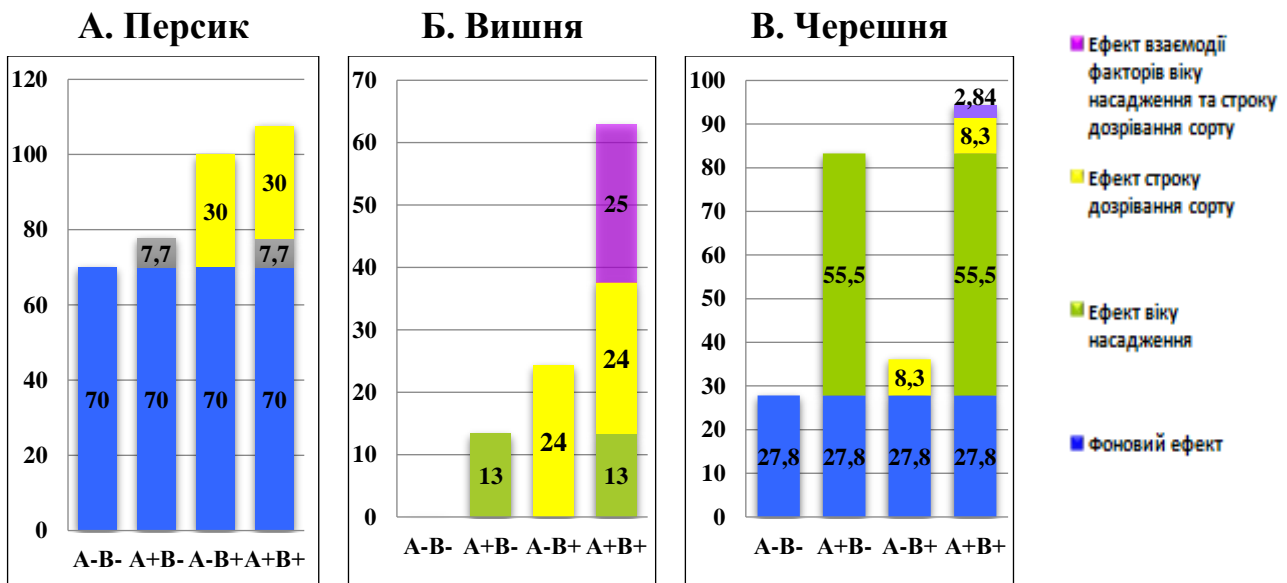


Рис. 4. Вплив віку та строків дозрівання на поширення у насадженнях кісточкових культур вірусу НКП

З'ясовано, що найбільший додатковий популяційний ризик бути інфікованими ВНКП у насадженнях 7–9 років мають середні та пізні сорти персика ($RD = 22,2\%$, $p = 0,0477$) і вишні ($RD = 38,8\%$, $p = 0,015$) порівняно з групою ранніх і надранніх. З'ясування можливості додаткового популяційного ризику інфікування насаджень ВШС показало, що цей вірус також має привабливіші цілі для інфікування – пізні та середні сорти в насадженнях персика ($RD = 57,8\%$, $p = 0,00$) та абрикоса ($RD = 19\%$, $p = 0,00$).

Показник відносного ризику дав змогу оцінити рівень асиметричності поширення вірусів у насадженнях кожної культури. Найбільш асиметричне поширення ВНКП має місце у насадженнях вишні, де цей показник є найвищим ($RR = 2,6$). У решти проаналізованих випадків ця характеристика є менш

вираженою: від $RR = 1,13$ у черешні до $RR = 1,4$ у абрикоса. Особливо високий ризик асиметричного поширення ВШС має в насадженнях персика ($RR = 13,9$), в насадженнях абрикоса ця тенденція виражена слабкіше ($RR = 1,5$). Урахування додаткового популяційного (RD) та відносного (RR) ризиків під час сортовипробування уможлиблює підбір оптимальних стратегій корекції фітовірусологічного стану насадження вже під час його закладання з метою підвищення продуктивності та мінімізації можливих втрат урожаю.

Вивчення спеціалізації вірусних патогенів до інфікування кісточкових та ягідних порід. Система оцінювання атрактивності сортів кісточкових культур для вірусних патогенів під час сортовипробування може бути елементом оцінювання адаптивного потенціалу сорту до певних екологічних умов вирощування та методом відбору найперспективніших сортів з обмеженою атрактивністю для колонізації вірусами, особливо при змінах клімату. Поглиблений аналіз поширення основних вірусів у насадженнях кісточкових та ягідних культур, проведений з використанням статистичної моделі, яка дає змогу оцінити неоднорідність поширеності певного вірусу в матеріалі чи насадженнях різних господарів (культур), продемонстрував, що універсальні віруси, до яких належать всі проаналізовані у роботі, за винятком ВККМ, для успішного поширення обирають тактику селективності.

Для статистичного оцінювання рівня атрактивності рослин-господарів для колонізації вірусними патогенами запропоновано метод чотирьохпольних матриць з обчисленням приведенного коефіцієнта контингенції, який може приймати значення $-1 \leq \varphi \leq 1$, і який було запропоновано як коефіцієнт селективності вірусу ($I_{vs_{ik}}$) (табл. 4).

Таблиця 4

Коефіцієнти селективності вірусів (F_{ik}) до кісточкових та ягідних культур

Культура	ВШС	ВКС	ВНКП	Культура	ВЛКПС	ВКПМ	ВМР	ВЧКТ
Алича	-0,076	-0,034	-0,064	Смородина	-0,260	0,088	-0,107	-0,082
Абрикос	-0,050	-0,082	-0,119	Порічка	-0,092	-0,015	-0,061	-0,005
Слива	0,006	-0,059	-0,127	Малина	0,181	0,407	0,263	0,060
Персик	0,145	0,027	0,236	Ожина	-0,166	-0,252	-0,058	-0,165
Вишня	0,071	0,078	0,049	Агрис	-0,018	-0,122	-0,008	0,007
Черешня	-0,024	0,092	0,082	Суниця	0,302	-0,077	-0,071	0,152

Дані кореляційного аналізу продемонстрували наявність статистично значущого зв'язку між рівнем розповсюдження вірусу та його індексом селективності як у кісточкових ($0,003 < p < 0,041$), так і ягідних ($0,002 < p < 0,022$) культур. Цей підхід може бути застосовано під час сортовипробування, адже різні сорти мають різний рівень привабливості для вірусних інфекцій, який доцільно уточнювати в умовах природного фону в зоні районування сорту. Використання чотирьохпольних таблиць спряженості ознак дає змогу обчислити інший важливий показник – відношення шансів (θ_{ik}) або шансових переваг (odds ratio), який є мірою можливості інфікування i -тим вірусом саме господаря k порівняно з іншими господарями (табл. 5).

Шансові переваги (θ_{ik}) інфікування вірусними інфекціями

Культура	ВНКП	ВШС	Культура	ВЛКПС	ВКПМ	ВМР	ВЧКТ
Алича	0,619	0,360	Смородина	0,189	0,653	0,000	0,640
Абрикос	0,459	0,630	Порічка	0,467	0,904	0,000	0,961
Слива	0,469	1,045	Малина	2,380	6,894	4,749	1,359
Персик	4,224	3,053	Ожина	0,143	0,000	0,000	0,108
Вишня	1,412	1,136	Агрус	0,823	0,166	0,768	1,083
Черешня	1,516	0,727	Суниця	4,540	0,656	0,143	2,224

Чим вище значення цього показника (θ_{ik}), тим вірогідніший прогноз того, що рівень інфікування саме цього господаря перевищить рівень інфікування інших господарів (культур, сортів). У технологіях виробництва здорового садивного матеріалу проблема вірусного ре-інфікування посідає центральне місце. Для її розв'язання в схемах сертифікації передбачено низку заходів, у тому числі просторову ізоляцію. Показник відношення шансів (θ_{ik}) уможливує раціональне вирішення проблеми дистанцій просторової ізоляції молодих і старих монокультурних і полікультурних насаджень. Жорсткі обмеження щодо дистанціювання монокультурних насаджень потребують, згідно обчислених показників, персик (θ_{ik} ВНКП = 4,224), вишня (θ_{ik} ВНКП = 1,412), черешня (θ_{ik} ВНКП = 1,516), малина (θ_{ik} ВКПМ = 6,894) та суниця (θ_{ik} ВЛКПС = 4,540).

Забезпечення ефективного контролю фітовірусологічного статусу маточних насаджень кісточкових культур. Одна з основних проблем детекції системних патогенів скринінговими методами – наявність хибно негативних результатів, зумовлених низькою концентрацією патогена в матеріалі. За використання поліклональних антитіл, які розпізнають кілька епітопів на одному антигені, завжди постає проблема чутливості та специфічності методу через те, що сироватка містить суміш антитіл різної афінності. На етапі утримання рослин у добазових колекціях постало питання специфічності поліклональних тестових систем для ІФА під час виявлення суміші локальних ізолятів ВНКП та ВШС. З огляду на велику кількість випадків з допороговими значеннями результатів тестів, важливим напрямом оптимізації тестування цим методом для ефективного вилучення вірус-інфікованих рослин зі схем розмноження є корекція операційних характеристик тесту.

Для з'ясування дискримінаційних можливостей двох тестових систем для детекції ВШС відбір зразків проведено у колекційних насадженнях аличі, сливи, персика, абрикоса, черешні та вишні Артемівської дослідної станції розсадництва ІС НААН. Розраховані ймовірнісні оцінки позитивних і негативних результатів тесту з акцентом на показниках, які є оцінками квоти хибно негативних і хибно позитивних результатів тесту і не залежать від розмірів вибірки, зокрема, негативне (-LR) та позитивне (+LR) відношення правдоподібності.

З'ясовано, що тест-система виробництва Loewe Phytodiagnosics незадовільно виявляє локальні ізоляти ВШС, завдяки чому поширення ВШС у

насадженнях персика, сливи, абрикоса і аличі є недооціненим на 20,6 %, вишні і черешні – на 37,5 %, що свідчить про циркуляцію в насадженнях ізоляту вірусу, близького до атипового штаму ВШС Вайнона. У відповідності до проведених розрахунків, для зниження квоти хибно негативних зразків під час тестування рослинного матеріалу сливової та вишневої групи (табл. 6) імуноглобулінами виробництва Agdia необхідно застосовувати 2-разову границю між позитивним і негативним значенням тесту для мінімізації показників (-LR) відповідно до – LR = 0,000 та -LR = 0,819. Це забезпечує додаткове вилучення з виробництва відповідно 28,4 та 13,2 % інфікованих рослин з хибно негативним значенням тесту.

У разі тестування рослинного матеріалу вишневої групи доцільно паралельно доповнити такий аналіз тест-системою виробництва Loewe за 3-разового порогового значення тесту. Застосування обох тестових систем з оптимізованими операційними характеристиками дає змогу виключити додатково 26,2 % хибно негативних випадків тестування рослин вишневої групи.

Таблиця 6

Значення операційних характеристик тестування методом ІФА для детекції ВШС за різного значення границі між позитивним і негативним результатом тесту (2- та 3-разова границя)

Показник	Сливова група				Вишнева група			
	2-разова		3-разова		2-разова		3-разова	
	Agdia	Loewe	Agdia	Loewe	Agdia	Loewe	Agdia	Loewe
+LR	3,500	inf	1,060	1,054	1,792	2,056	1,151	1,213
-LR	0,000	0,435	0,986	0,980	0,819	0,940	0,758	0,799
Sen+Spec	1,714	1,565	0,989	0,976	0,976	0,444	0,907	0,897

Скринінгові тестування матеріалу різних культур на наявність ВНКП методом ІФА продемонстрували культуроспецифічні особливості. Оптимізація операційних характеристик тесту показала, що для підвищення достовірності слід застосовувати 2-разову границю між значеннями позитивного і негативного тесту під час тестування рослинного матеріалу аличі та абрикоса та 1,75-разову – у разі тестування зразків сливи та черешні (табл. 7).

Таблиця 7

Значення операційних характеристик тестування методом ІФА для детекції ВШС за різного значення границі між позитивним і негативним результатом тесту (2-разова та 1,75-разова границя)

Показник	Абрикос		Алича		Слива		Черешня	
	2-разова	1,75-разова	2-разова	1,75-разова	2-разова	1,75-разова	2-разова	1,75-разова
+LR	36,000	12,083	inf	1,925	5,733	2,826	12,222	inf
-LR	0,000	0,604	0,250	0,281	0,377	0,256	0,353	0,167

Коригування граничного значення тесту для оптимізації негативного відношення правдоподібності (-LR) дає змогу підвищити ефективність

вилучення хибно негативних рослин аличі, абрикоса, черешні та сливи в маточниках відповідно на 20 %, 13,5, 4,5 та 3,4 %.

РОЗРОБЛЕННЯ СИСТЕМИ ОЦІНЮВАННЯ ЯКОСТІ САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ КІСТОЧКОВИХ ТА ЯГІДНИХ КУЛЬТУР У ПРОЦЕСІ РОЗМНОЖЕННЯ ТА ОЗДОРОВЛЕННЯ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

Для оцінювання складових процесу оздоровлення, зокрема змін концентрації вірусу, токсичного та генотоксичного ефектів, змін вірулентності вірусів було запропоновано алгоритм оцінювання якості садивного матеріалу (рис. 5), який дозволяє виділити біотехнології оздоровлення, оптимальні за тривалістю, ресурсозатратністю і впливом на життєздатність рослин.



Рис. 5. Алгоритм оцінювання якості садивного матеріалу в процесі його оздоровлення

Апроксимація процесів хемотерапевтичного оздоровлення сливи від вірусу шарки сливи в умовах *in vitro*. Вивчення перспективних сортів сливи свідчить про високу чутливість до інфікування ВШС сортів вітчизняної селекції Ненька та Сентябрьська, які поступаються іншим сортам за резистентністю і тому потребують особливої уваги. Для оздоровлення цих сортів використали рибавірин (5 та 10 мг/л) та СК (20 та 40 мг/л).

Відносні зміни кількості капсидного білка ВШС у рослинному матеріалі оцінено методом напівкількісного ІФА на різних етапах хемотерапії. З'ясовано, що зниження концентрації ВШС за даними напівкількісного ІФА в експлантатах сливи під дією СК та рибавірину найкращим чином характеризує логарифмічна функція (табл. 8).

Таблиця 8

Математичні вирази ефекту тривалості дії СК на елімінацію ВШС в експлантатах сливи сорту Ненька

Концентрація	Функція	Коефіцієнт детермінації (R^2)
СК 20 мг/мл	$y = -72,9\ln(x) + 98,458$	0,961
СК 40 мг/мл	$y = -24,15\ln(x) + 35,33$	0,889
Віразол 5 мг/л	$y = -12,25\ln(x) + 21,36$	0,935
Віразол 10 мг/л	$y = -11,11\ln(x) + 15,133$	0,952

Реалізація дії СК та рибавірину для елімінації ВШС у рослинах сорту Ненька відбулася з високою ефективністю за всіх застосованих доз. Аналіз графіків отриманих функцій показав (рис. 6), що для оптимізації схем

оздоровлення мікропагонів сливи від ВШС у разі застосування дози СК 20 мг/л повторне внесення віроциду доцільно робити після IV пасажу, на цей момент СК максимально реалізує антивірусний потенціал. Ефект пролонгованої дії рибавіріну був вираженішим, ніж ефект СК. Згідно з коефіцієнтами детермінації (R^2) повнота реалізації антивірусного потенціалу СК з підвищенням дози зменшилася, а рибавіріну – збільшилася.

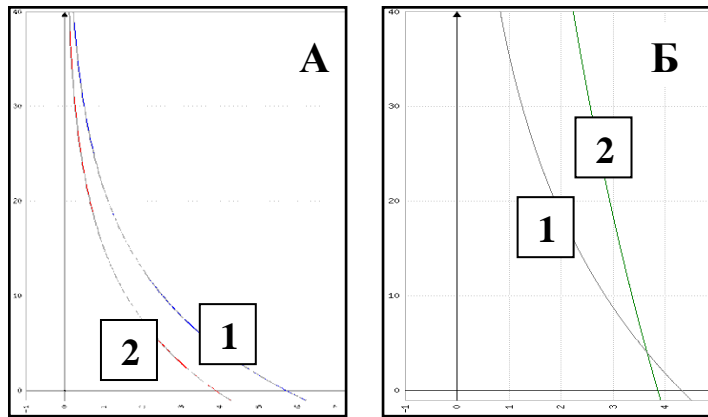


Рис. 6. Графіки логарифмічних функцій, які описують ефект тривалості дії на елімінацію ВШС: А – СК 20 мг/л (1) та СК 40 мг/л (2); Б – рибавірін 5 мг/л (1) та рибавірін 10 мг/л (2) (вісь абсцис – кількість пасажів, вісь ординат – залишкова кількість вірусу,%).

Зменшення концентрації у швидкій фазі дії препаратів в експлантатах сорту Сентябрьська спостерігали лише після I пасажу. Після II пасажу всі заміри показали негативний результат. Відтак, сорт сливи Сентябрьська є високочутливим до дії обох антивірусних препаратів вже у швидкій фазі.

Усі застосовані дози СК та рибавіріну проявили достовірний токсичний ефект. З огляду на коефіцієнти варіації, мікропагони, оброблені СК 40 мг/л, були найменш морфологічно однорідними. Токсична дія обох препаратів на культуральні рослини сливи виявилася короткотерміною, адже на II та подальших пасажах достовірну різницю між ними за масою в різних варіантах досліду не спостерігали.

На IV пасажі методом ЗТ-ПЛР було проаналізовано наявність вірусу в пробах всіх чотирьох варіантів досліду з оздоровлення сортів Ненька та Сентябрьська (рис. 7).

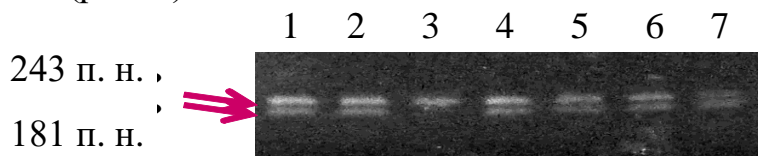


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ЗТ-ПЛР вірусу шарки сливи в експлантатах сливи сорту Ненька з праймерами до консервативних ділянок гену капсидного білка (243 п. н.) та внутрішнього контролю (181 п. н.): 1 – польовий зразок; 2 – позитивний контроль; 3 – СК 20 мг/л; 4 – СК 40 мг/л; 5 – віразол 5 мг/л; 6 – віразол 10 мг/л; 7 – віразол 10 мг/л.

Застосовані оздоровчі процедури значно знизили титр вірусу, але не забезпечили повного звільнення від нього. Отже, один раунд обробки

рибавірином та СК у застосованих концентраціях виявився недостатнім для повного звільнення від ВШС.

Сиквенс геномної ділянки капсидного вірусного білка ізолятів ВШС виділених з польових рослин сорту Ненька (табл. 9) та Сентябрьська, просиквеновані методом обривання ланцюга в обох напрямках, були абсолютно ідентичними. Ізолят сорту Ненька зареєстровано у світовій базі даних: KJ914573. Філогенетичний аналіз цих ізолятів показав, що рівень їх гомології з відомими українськими ізолятами штаму Дідерон (див. рис. 7) становить 99,8 %, і що вони віддалені від українських ізолятів, які були зареєстровані в Канаді і належать до штаму Вайнона (рис. 8).

Таблиця 9

Нуклеотидна форвард-послідовність просиквенованої ділянки геному вітчизняного ізоляту ВШС, виділеного з рослин сливи сорту Ненька

```
Gcgggtgtctctctgtgtcctcttctgtgtccgacgtttccatccaagccaaataaacgatttgaacatttctcaatg
ctgctgccttcatctggatatgagcttcacgtgcccgtaggggtgtcgttgaagtcatttcgtaaaaatcaaaaggcatat
ctggcgaggctgtagtctga
```

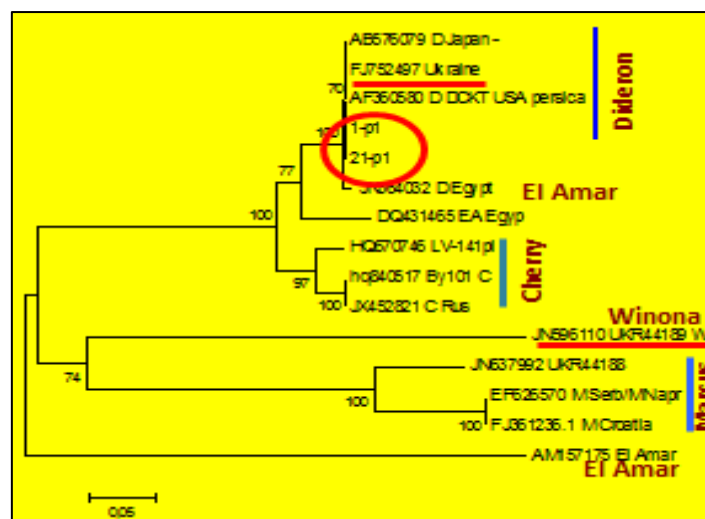


Рис. 8. Філогенетичне дерево, побудоване з використанням послідовностей фрагмента гена капсидного білка українських ізолятів ВШС за допомогою програми MEGA 5, метод NJ, модель р-дистанцій, 1000 бутстреп реплікацій (I-p1 та 2I-p1 – виділені в роботі ізоляти ВШС)

Отримані продукти ампліфікації у варіантах досліду із застосуванням вищих концентрацій віроцидів, зокрема СК 40 мг/л та рибавірин 10 мг/л, було також просиквеновано для перевірки на можливі мутації, оскільки ця ділянка вірусного генома є визначальною для ідентифікації всіх штамів ВШС. З'ясовано, що виділені фрагменти гена капсидного білка ВШС мають 100 % гомології з відповідними фрагментами гена польових рослин. Відтак, одна з визначальних для специфічності взаємовідносин вірус – господар ділянок генома ВШС штаму Дідерон є висококонсервативною і зберігає свою генетичну ідентичність протягом культивування експлантатів на середовищах із мутагенними сполуками. Високий рівень її стабільності в умовах впливу

додаткових стрес-факторів забезпечує достатній рівень універсальності цього методу для виявлення ВШС.

Контроль генетичної ідентичності мериклонів сливи проведено за використання трьох сайт-специфічних праймерів до довгих кінцевих повторів мініатюрного ретротранспозону *malus-TRIM* (K002, K005, K009) та чотирьох до сайту зв'язування РНК (iPBS-2237, iPBS-2272, iPBS-2077, iPBS-2232). Генетичного поліморфізму отриманих молекулярно-генетичних маркерів у спектрах ампліфікації геномної ДНК експлантатів обох сортів сливи виявлено не було (рис. 9), що свідчить про відсутність мутацій у геномі досліджуваних сортів у відповідь на дію мутагенних стрес-чинників.

Таким чином, застосовані дози препарату рибавірин та СК мають пролонгований терапевтичний ефект на елімінацію ВШС, не мають токсичного та генотоксичного ефектів на експлантати сливи і можуть бути використані в схемах її оздоровлення з каскадним внесенням віроцидів.

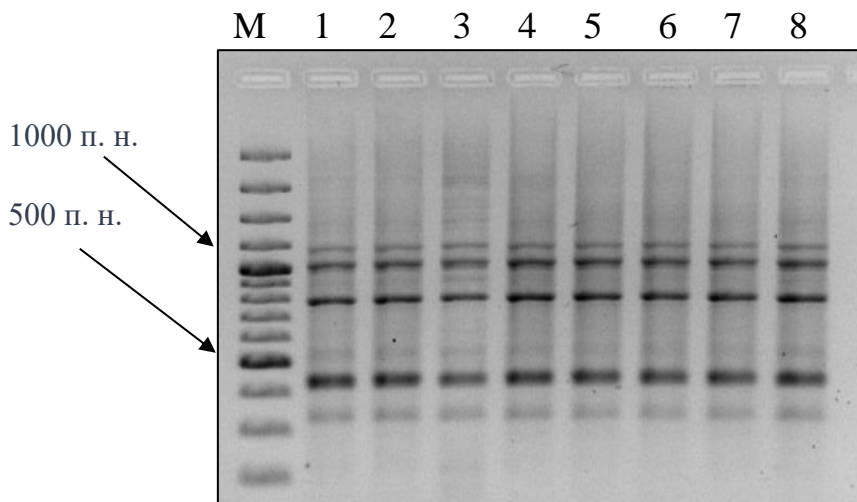


Рис. 9. Електрофореграма продуктів ПЛР геномної ДНК оздоровлених експлантатів сливи сорту Ненька з праймером K008: М – маркер молекулярної маси DNALadder 1kb plus; 1 – польова рослина; 2–4 – експлантати після хемотерапії з СК; 5–8 – експлантати після хемотерапії з рибавірином.

Оздоровлення підщепи черешні Гізела 6 від ВСЛЧ. Для розроблення схеми оздоровлення підщепи вивчено дозозалежний ефект антивірусної дії СК (10 мг/л, 15 і 20 мг/л) та аміксину (100 мг/л, 150 і 200 мг/л) на елімінацію ВСЛЧ. На I пасажі достовірна різниця для СК мала місце лише між варіантами I і III. Виявлено пропорційність змін між умістом СК у середовищі та залишковою кількістю капсидного білка. Цей факт свідчить про те, що, незважаючи на декілька механізмів дії СК на обмеження вірусної інфекції в рослині, основний механізм її впливу на елімінацію ВСЛЧ в експлантатах підщепи Гізела 6 пов'язаний з процесами, що підпорядковуються лінійно-регресивним моделям.

Усі три дози аміксину проявили потужнішу антивірусну дію порівняно із застосованими дозами СК. Аміксин поступається СК за рівнем реалізації антивірусного потенціалу – у фазі швидкої дії його терапевтичний ефект лише на 57 % залежить від застосованої дози (табл. 10). На четвертому пасажі всі протестовані експлантати, оброблені аміксином, продемонстрували безвірусний

статус на рівні чутливості методу. На прикладі використання СК для елімінації вірусу СЛЧ видно, що диверсифікація доз антивірусного препарату є доцільною лише для досягнення швидкого результату.

Таблиця 10

Апроксимація дозозалежного ефекту антивірусної дії саліцилової кислоти та аміксину на елімінацію вірусу СЛЧ в експлантатах підщепи Гізела 6

Препарат	Пасаж	Рівняння	R ²
СК	I	$y = -22,01\ln(x) + 35,78$	0,9753
	IV	$y = -69,33\ln(x) + 75,942$	0,8742
Аміксин	I	$y = -12,87\ln(x) + 18,621$	0,5693
	IV	$y = 0$	1

На I пасажі паралельно зі зменшенням концентрації вірусного капсидного білка під дією СК спостерігали і достовірне зниження маси експлантатів ($\text{cor} = 0,933$, $p = 0,075$). На IV пасажі такий зв'язок порушувався, достовірної кореляції не спостерігали ($\text{cor} = 0,570$, $p = 0,614$). Але загалом на IV пасажі відмічено також пригнічення росту експлантатів, які оброблялись СК, порівняно з контрольними зразками. З'ясовано, що дозозалежний ефект впливу цієї сполуки на життєздатність рослин у найкращий спосіб описують лінійні рівняння. Зміна маси експлантатів, оброблених аміксином, відбувалася непропорційно до застосованих доз. Спроба апроксимації цього процесу показала, що він мало чутливий до змін застосованих концентрацій віроциду, що свідчить про практичну відсутність інтервалу між терапевтичною та токсичною дозами препарату (табл. 11).

Таблиця 11

Апроксимація змін маси експлантатів підщепи Гізела 6 під впливом СК та аміксину на різних пасажах

Препарат	Пасаж	Рівняння	R ²
СК	I	$y = -12x + 83,667$	0,9643
	IV	$y = -7,5x + 66,3$	0,8096
Аміксин	I	$y = -8,75x + 109,67$	0,243
	IV	$y = 3,7x + 68,333$	0,4704

З огляду на особливості перенесення ВСЛЧ через водне живлення та контакти між корінням, перевірено можливі зміни фітовірусологічного статусу рослинного матеріалу, що розмножують у культурі *in vitro* за одночасного культивування в одній культиваційній ємності здорових та інфікованих експлантатів. Для цього в кожен ємність висаджували по 7 рослин: по центру – інфіковану рослину, по периферії – 6 мікроклонів від здорових експлантатів (рис. 10). Дослід виконано у п'ятиразовому повторенні. Рослини у перших п'яти посудинах висаджено на середовище для проліферації, MS+0,5 мг/л БАП, в інших п'яти – на середовище MS з додавання 0,5 мг/л ІМК для коренеутворення, після чого методом ІФА було оцінено можливі зміни фітовірусологічного статусу експлантатів (табл. 12).

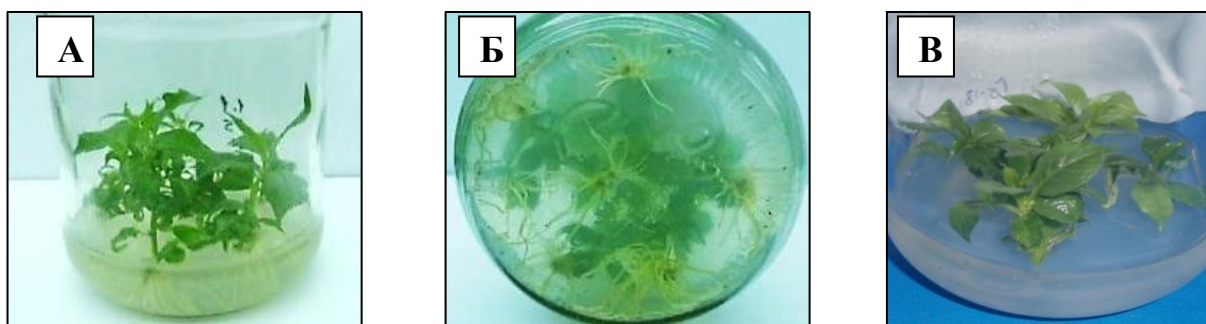


Рис. 10. Експлантати підщепи Гізела 6 у фазі коренеутворення (А,Б); у фазі пагоноутворення (В)

Таблиця 12

Відносні показники екстинкції зразків у різних варіантах досліду з реінфікування експлантатів вірусом СЛЧ

Середовище для пагоноутворення (MS + 0,5 мг/л БАП)		Середовище для коренеутворення (MS + 0,5 мг/л ІМК)	
здорові	інфіковані	здорові	інфіковані
1,096±0,1305**	2,304±0,386**	1,426±0,2330***	2,526±0,448***

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Було виявлено достовірну позитивну кореляцію між відносними показниками оптичної густини в інфікованих і здорових експлантатів у п'яти посудинах, що вирощувалися на живильному середовищі для коренеутворення ($\text{corr} = 0,909$, $p = 0,032$). Таким чином, із підвищенням концентрації вірусу в інфікованій рослині збільшується ймовірність його перенесення на сусідні експлантати в одній культивацийній ємності.

У варіанті досліду на живильному середовищі для пагоноутворення така кореляція була недостовірною ($\text{corr} = 0,736$, $p = 0,157$). Отже, зміни здорового статусу матеріалу відбувалися саме на середовищі для коренеутворення, тобто там де у експлантатів сформовано повноцінне коріння і мали місце контакти між корінням сусідніх рослин.

Виявлено токсичний ефект дії антивірусних препаратів на ВСЛЧ, який проявив себе як підвищення вірулентності вірусу. Застосування антивірусного препарату спрацювало для ВСЛЧ як фактор штучного добору на більш стійкі та адаптовані до абіотичних стресів вірусні популяції. Зокрема, у експериментальних рослин кількість вірусів на XII пасажі вже перевищувала кількість вірусів у контрольних рослинах (рис. 11).

Додавання в середовища як БАП, так і ІМК спрацювало як стимулювальний чинник для відтворення вірусів, однак у разі застосування аміксину відновлення концентрації ВСЛЧ на всіх типах середовища відбувалося повільніше. Водночас цей процес у мікропагонів, що культивували на безгормональному середовищі, мав тенденцію до стабілізації або до утворення плато після XII–XIII субкультури.

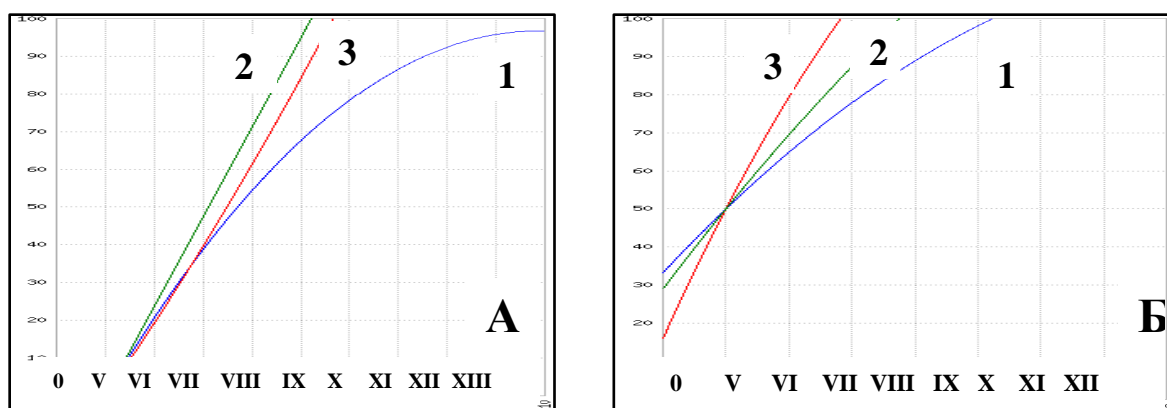


Рис. 11. Графіки функцій, що описують відновлення концентрації вірусу скручування листа черешні на V–XII пасажах в експлантатах підщепи Гізела 6: А – оброблених аміксином; Б – оброблених СК (1 – безгормональне середовище; 2 – БАП 1 мг/л; 3 – ІМК 1 мг/л) (вісь абсцис – кількість пасажів, вісь ординат – залишкова кількість вірусу,%).

Для контролю генетичної ідентичності мериклонів Гізела 6 використано метод IRAP-ПЛР з праймерами до довгих кінцевих повторів соєвого ретротранспозону SIRE-1, кінцевих повторів мініатюрного ретротранспозону Malus-TRIM (K002 K008, K005) та сайту зв'язування РНК (iPBS-2237, iPBS-2272, iPBS-2077). Загалом отримано 48 мономорфних IRAP-маркерів, що свідчить про відсутність мутацій і генетичну ідентичність експлантатів Гізели 6.

Оздоровлення експлантатів агрусу від ВЧКТ. Об'єктами дослідження слугували перспективні сорти агрусу середнього терміну дозрівання – Сварог і Тясмин. Частину мікропагонів культивували на середовищах з віроцидами аміксин, СК та рибавірин протягом одного місяця, другу – упродовж двох. Експлантати агрусу проявили себе високочутливими до токсичної дії всіх трьох антивірусних сполук. Доза аміксину 200 мг/л виявилася токсичною для обох сортів (рис. 12). Переважна більшість рослин, оброблених цим препаратом, загинула у місячний термін. У фазі швидкої дії цей препарат проявив себе як найбільш потужний. Ефект токсичної дії СК та рибавірину спостерігали лише після трьох раундів культивування на середовищі без віроцидів.

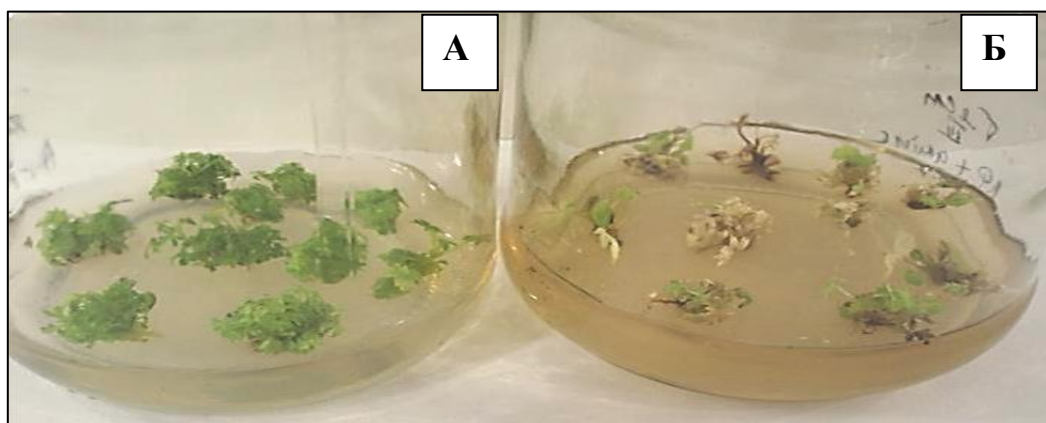


Рис. 12. Фітотоксичний вплив аміксину на агрус сорту Тясмин в кінці третього тижня культивування: А – контрольні рослини, Б – рослини на середовищі з додаванням аміксину (200 мг/л).

На V пасажі у варіанті досліді з місячним культивуванням на середовищі з віроцидом відносно м'яка доза СК 20 мг/л виявилася летальною для 50 % експлантатів сорту Тясмин. Найменш токсичним проявив себе рибавірин. Токсичний ефект усіх трьох препаратів виявився сортоспецифічним, при цьому зниження концентрації капсидного вірусного білка не було пропорційним токсичній дії антивірусних сполук.

Реалізація антивірусного потенціалу СК та рибавірину для елімінації ВЧКТ залежить від тривалості культивування на середовищі з віроцидом (рис. 13). Варіанти обробки СК з двохмісячним культивуванням і рибавірину з одномісячним були універсальнішими для обох сортів. Оптимальним за результативністю хемотерапевтичної дії і відсутністю впливу на життєздатність культуральних рослин агрусу проявив себе рибавірин. Він повніше реалізував терапевтичний потенціал (82,5–90,7 %) порівняно з СК (78,3–92,1 %). Після двох місяців культивування на середовищі з БАП в експлантатах, що пройшли одномісячну обробку рибавірином, на рівні достовірності методу ВЧКТ не було детектовано. Виявлено синергічний ефект на елімінацію ВЧКТ в рослинах обох сортів між рибавірином і БАП. Виявлено антагоністичну, або нейтральну дію БАП на антивірусні властивості СК.

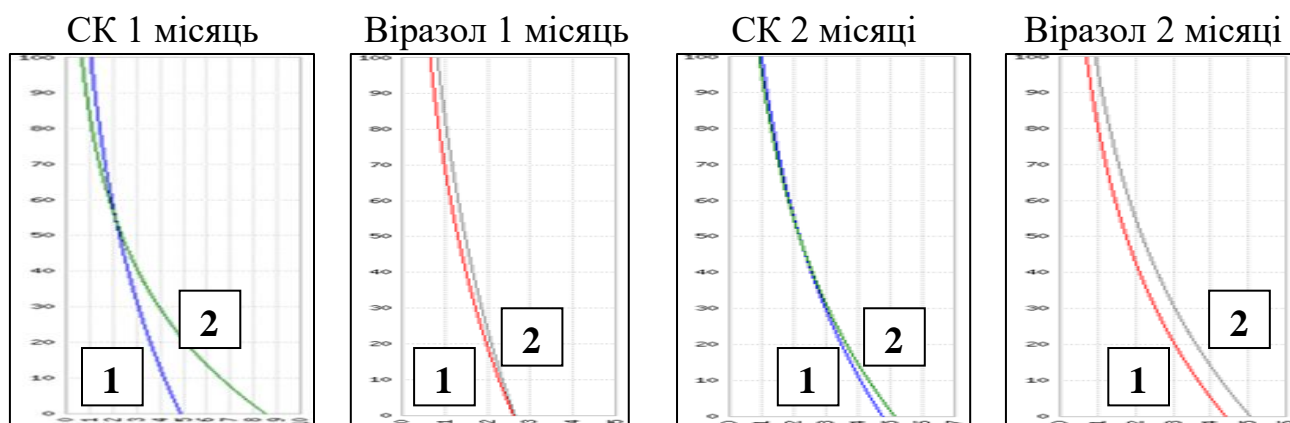


Рис. 13. Графіки логарифмічних функцій, що описують процес падіння концентрації вірусу ЧКТ в експлантатах агрусу сортів Тясмин (1) та Сварог (2) під дією СК та віразолу (вісь абсцис – кількість пасажів, вісь ординат – залишкова кількість вірусу, %)

Агрис – єдина культура, для якої виявлено культуральні рослини, генетично неідентичні польовій. У спектрах ампліфікації сорту Тясмин за використання праймера 2272-iPBS виявлено маркер розміром приблизно 500 п. н., який відсутній у спектрах рослин сорту Сварог (рис. 14). Появу неспецифічного фрагменту з такою самою довжиною зафіксовано у двох контрольних та однієї експериментальної рослини цього сорту. Специфічний генетичний маркер сорту Тясмин і неспецифічний – сорту Сварог було просиквеновано. Рівень генетичної ідентичності між двома послідовностями становив 99 %. Виявлено лише дві одиничні нуклеотидні заміни (позиції 327 та 483) та делецію цитозину в позиції 454 у геномній ділянці сорту Сварог.

Результати вирівнювання отриманих послідовностей із відомими ділянками рослинних геномів продемонстрували певний рівень її генетичної

ідентичності з 1 по 170 п. н., а в деяких випадках з 1 по 270 п. н., з геном кукумізину, який залучений у численні фізіологічні процеси, зокрема гіперчутливі відповіді та старіння, тому зміни в цих послідовностях можуть мати широкий спектр наслідків для рослини. У просиквенованій ділянці виявлено чотири *tata*-бокси, що свідчить про її високу транскрипційну активність (табл. 13).

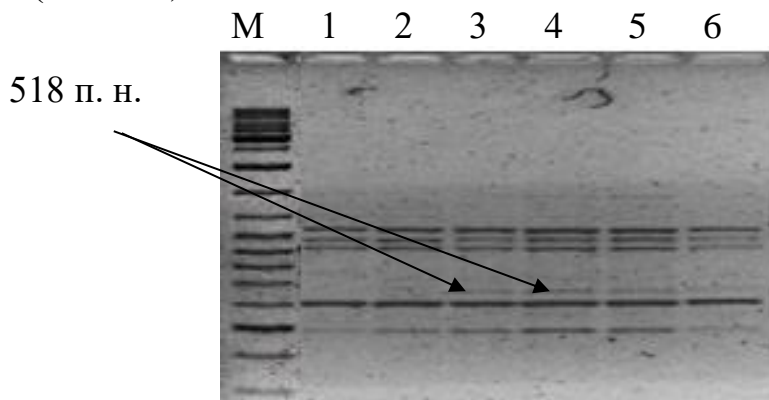


Рис. 14. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами 2272-іPBS геномної ДНК експлантатів агрусу після обробки рибавірином, IV пасаж: М – маркер молекулярної маси Mass ruler DNA ladder mix; 1–3 – сорт Сварог; 4–6 – сорт Тясмин.

Таблиця 13

Нуклеотидна послідовність сортоспецифічного фрагменту геномної ДНК агрусу сорту Тясмин, отриманої з використанням праймеру іPBS-2272

```

ggctcagatg ccaatatact tcaggccctt gatgatgctg ttgetgacgg tgtggattta atctctctct cagttggg
gcgtattctt agaccctact ttatcgactc aattgccata ggtgcatttc atgccaatgaa aaatggaata ctcacctcgg
tgcggcccg aaatgccggt caagttttat ctccactgt taatgttgca ccctggcttc tctcagtagc ggccaacasa
atggaccgta agttctttgc caagtgacta cttgtaata atgaaagctt tgaggtaatg ttctcatcta ttttagtca gaaaaagga
tcttttata ttcttgtaaa cagtttata ctaagtagta tatgtgtct atgctcgtt gtgatgcaac gtagggaatt tctgtgaata
cgtttgatct taacaacacc atgtatccct tagtttggg gggttttcc aactcaagtg ttaccacat tgatatggg ttgagtgga
tctgagcc

```

Вплив віроцидів на змішану вірусну інфекцію в експлантатах малини.

Для з'ясування особливостей оздоровлення рослин малини від комплексної вірусної інфекції оцінено вплив трьох віроцидів: СК, рибавірину та аміксину на зниження концентрації вірусних капсидних білків ВЛКПС, ВКПМ, ВЧКТ та ВККМ в мікропагонах двох перспективних гібридних форм малини (табл. 14).

Виявлено високий рівень реалізації потенціалу антивірусної дії рибавірину (69–99 %) та СК (74,1–98,6 %) для елімінації вірусів ВЛКПС, ВКПМ та ВЧКТ. Обидва препарати виявилися менш ефективними для зниження титру вірусу ВККМ – 69,35 та 6,9 % відповідно. Терапевтичний ефект рибавірину та СК майже для всіх вірусів було достовірно апроксимовано до спадної логарифмічної функції. Винятком став лише варіант для ВККМ та СК ($R^2 = 0,069$). Зміни концентрації вірусів у відповідь на дію аміксину не було достовірно апроксимовано до жодної математичної функції. Виражені терапевтичні наслідки оздоровлення спостерігали лише на 11 місяці утримання.

Зокрема серед рослин, оброблених СК, частка безвірусних рослин становила 35 %, рибавірином – 60 %, аміксином – 60 %.

Таблиця 14

**Загальна маса експлантатів малини на XI пасажі,
оброблених різними віроцидами**

Віроцид	Гібридна форма 3		Гібридна форма 4	
	маса експлантатів, мг	коєф. варіації	маса експлантатів, мг	коєф. варіації
СК 20 мг/л	93,0±6,71*	7,21	93,2±7,78*	8,34
Рибавірин 20 мг/л	42,4±14,19*	33,46	84,8±26,5	49,23
Аміксин 200 мг/л	42,0±11,09*	26,41	61,4±30,4	49,45
Контроль	75,0±19,6	26,13	66,2±16,05*	24,25

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$

Виявлено ефект пригнічення росту мікропагонів малини за тривалого культивування після обробки рибавірином та аміксином (див. табл. 14). Найбільшу біомасу мали рослини, оброблені СК (рис. 14). Цей ефект використано для оптимізації адаптації оздоровлених рослин малини до умов *in vivo* та для дохемотерапевтичної обробки експлантатів. Перед адаптацією до умов *in vivo* рослини, що пройшли оздоровлення упродовж одного пасажу, культивували на середовищі з додаванням СК у концентрації 0,05 мг/л. Відмічено достовірне збільшення маси та кількості листків у рослин у варіанті досліду СК + СК. Варіанти послідовної обробки рибавірин + СК та аміксин + СК стимулювального ефекту на життєздатність рослин не виявили.

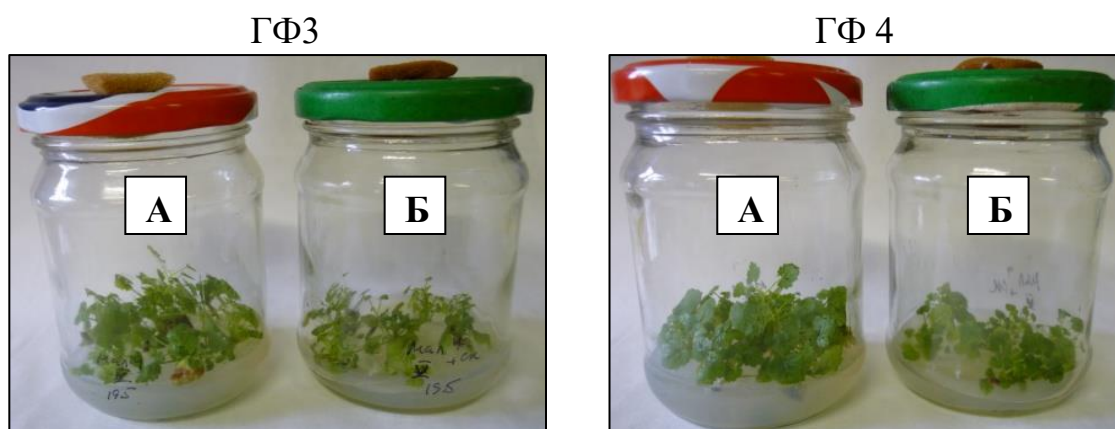


Рис. 14. Експлантати малини ГФ3 та ГФ4 на XI пасажі після одноразової обробки СК: А – після хемотерапії з СК, Б – контроль.

Попередня обробка мікророслин СК 0,05 мг/л упродовж одного пасажу мала вірусоспецифічний вплив на подальше оздоровлення аміксином та рибавірином. Синергічний ефект між двома послідовними обробками мав місце лише для варіантів СК + СК та СК + аміксин для елімінації вірусів ВЛКПС та ВЧКТ, СК + рибавірин – для вірусів ВККМ та ВЛКПС. Передобробка СК у всіх трьох комбінаціях мала найменшу ефективність оздоровлення рослин малини від ВКПМ. Відмічено зниження реалізації хемотерапевтичного потенціалу СК

на елімінацію ВЛКПС та ВЧКТ за умови високого титру цих вірусів в експлантатах.

Застосування рибавіріну в каскадних модулях оздоровлення малини.

Для детальнішого вивчення впливу рибавіріну на комплексну вірусну інфекцію за участі вірусів ВКПМ, ВЧКТ, ВЛКПС та ВККМ у малині виконано дослід із застосуванням трьох різних доз віроциду (20 мг/л, 50 та 100 мг/л) на трьох перспективних сортах і гібридних формах (Феномен, Осінній зорепад, ГФ8-3). Терапевтичні ефекти апроксимовано до спадних логарифмічних функцій з високим рівнем вірогідності ($0,7561 < R^2 < 0,9955$) (рис. 15).

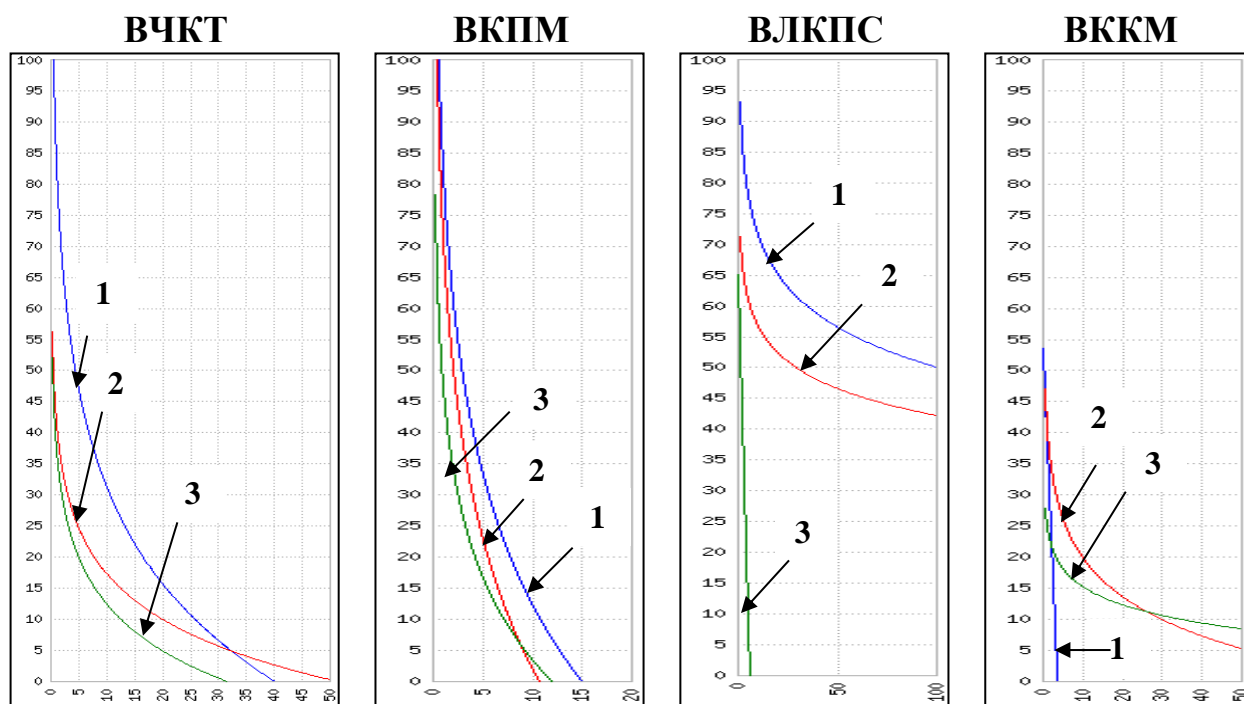


Рис. 15. Графіки функцій, що демонструють терапевтичний ефект дії віразолу на елімінацію різних вірусів: 1– віразол 20 мг/л; 2 – 50 мг/л, 3 – 100 мг/л (вісь абсцис – кількість пасажів, вісь ординат – залишкова кількість вірусу, %).

Дози рибавіріну 20 та 50 мг/л не мали достовірних відмінностей за впливом на зниження концентрації чотирьох вірусів на всіх етапах. Найповніше його антивірусний потенціал реалізовано для елімінації вірусів ВЧКТ та ВККМ. Достовірне зниження концентрації ВЛКПС відбулося лише у разі застосування дози 100 мг/л, яка проявила високий рівень фітотоксичності (рис. 16). Відновлення концентрації всіх вірусів в експлантатах після одноразової обробки зареєстровано на 7-му пасажі.

У рослин після повторної обробки рибавірином, яку виконано після IV субкультури, виявлено ефект післядії першої обробки віроцидом на зниження концентрації вірусів. Застосування високих концентрацій рибавіріну (100 мг/л) на першому раунді оздоровлення спровокувало підвищення вірулентності ВКПМ, оскільки повторна обробка за використання всіх трьох концентрацій віроциду не забезпечила звільнення від цього вірусу, тим часом експлантати, що пройшли на I етапі оздоровлення дозами 20 та 50 мг/л, мали безвірусний статус.

Зокрема, виділено найкращі комбінації застосування рибавіріну за двох послідовних обробок: рибавірин (20 мг/л + 100 мг/л); рибавірин (50 мг/л + 100 мг/л); рибавірин (50 мг/л + 50 мг/л). Таким чином, високі дози цієї сполуки недоцільно застосовувати у першому раунді оздоровлення для запобігання можливій генотоксичній дії на віруси, а на II етапі оздоровлення доцільно використовувати вищу за попередню дозу віроциду.

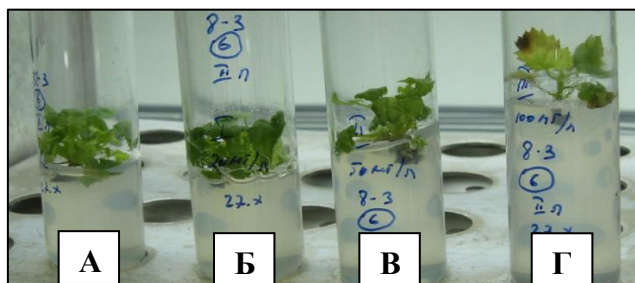


Рис. 16. Експлантати малини ГФ 8-3 на 6 пасажі культивування після обробки рибавірином: А – контрольні рослини; Б – рибавірин 20 мг/л; В – рибавірин 50 мг/л; Г – рибавірин 100 мг/л.

Порівняння незалежних дослідів з оздоровлення малини рибавірином продемонструвало можливості універсалізації схем хемотерапії (рис. 17). На кожному етапі оздоровлення експлантатів малини з комплексною інфекцією певний з вірусів був преференційною мішенню для дії віроциду, але швидкість падіння концентрації вірусів в обох дослідженнях були близькими.

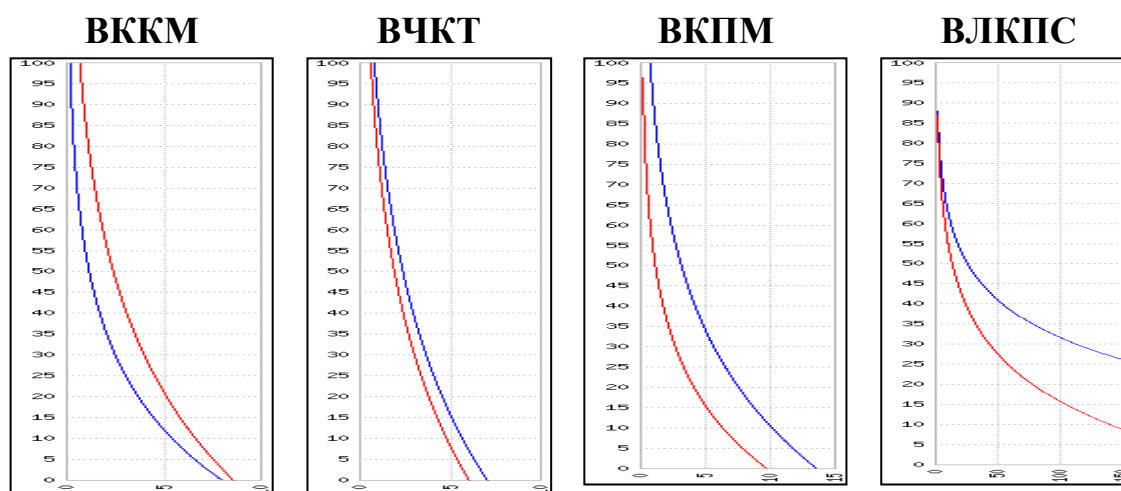


Рис. 17. Графіки функцій, що описують зниження концентрації капсидного білка чотирьох вірусів, отриманих у двох незалежних дослідів на експлантатах малини (вісь абсцис – кількість пасажів, вісь ординат – залишкова кількість вірусу, %)

Контроль генетичної ідентичності мікропагонів малини в процесі їх хемотерапевтичного оздоровлення виконували із застосуванням п'яти маркерних систем, зокрема K008, K005, iPBS-2237, iPBS-2272, iPBS-2077, iPBS-2373, iPBS-2376, які в сумі дали змогу отримати 38 мономорфних молекулярно-генетичних маркерів. Генетичних відхилень у оздоровлених

рослин малини порівняно з генетичними профілями польових рослин виявлено не було.

На основі узагальнених даних з оцінювання терапевтичного, токсичного та генотоксичного ефектів дії віразолу, СК та аміксину на оздоровлення рослин 11 сортів запропоновано використовувати в хемотерапевтичних схемах два модулі: каскадний та імпульсний.

Каскадний модуль передбачає хемотерапевтичну обробку та серію субкультур (від 4 до 5), або тривале культивування на стандартному середовищі без віроцидів. Такі модулі доцільно застосовувати для антивірусних сполук з вираженою пролонгованою дією (СК та рибавірин). Імпульсний модуль передбачає хемотерапевтичну обробку з подальшим короткотривалим культивуванням (1–2 пасажі на стандартному середовищі без віроцидів). У таких схемах можна застосовувати антивірусні препарати, які максимально ефективні у фазі швидкої дії – аміксин та рибавірин.

ВПЛИВ ЗМІШАНИХ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ НА ПОШИРЕННЯ ВІРУСІВ

При змінах клімату важливим аспектом стає тип взаємодії між вірусними патогенами. За умови синергічного типу можна очікувати посилення симптоматики та шкідливого впливу на рослину. Антагоністичний тип сприятиме пошуку нових джерел живлення для паразита та інтенсивнішому поширенню. Для оцінювання типів взаємодії між вірусами при змішаному інфікуванні запропоновано алгоритм із застосуванням оцінки коваріації вірусів, тенденцій до асоціативності і моноінфікування та визначення типів статистичної і біологічної взаємодії між вірусами при змішаній вірусній інфекції.

Коваріаційні тенденції між основними вірусами в насадженнях кісточкових культур. Для оцінювання парної асоціації вірусів або екологічного синергізму застосовано коефіцієнт Жаккара. Для урахування неоднорідності поширення вірусів обчислено стандартну похибку індексу Жаккара із застосуванням непараметричної статистичної техніки обрахунків «jackknife» (Dixon, 1993). За підсумком проаналізованих показників цього індексу культура персика є оптимальною нішею екологічного співіснування для ВШС, ВНКП та ВКС. Вірогідність змін вірулентності ВШС найвища в насадженнях персика, найменша – абрикоса та сливи, зміни трансмісивності цього вірусу можна очікувати в насадженнях сливи та абрикоса (табл. 15).

Таблиця 15

Коефіцієнт парної асоціації Жаккара між ВШС, ВКС та ВНКП

Культура	Коефіцієнт Жаккара (J)		
	ВШС vs ВНКП	ВШС vs ВКС	ВНКП vs ВКС
Абрикос	0,028±0,0025	0,021±0,0010	0,049±0,0081
Алича	0,118±0,0248	0,200±0,0496	0,068±0,0093
Персик	0,347±0,3522	0,305±0,2108	0,118±0,0154
Слива	0,028±0,0011	0,035±0,0019	0,033±0,0059

Для культури вишні та черешні найвищий рівень парної асоціації спостерігали між вірусами СЛЧ та НКП (табл. 16). Не виявлено достовірної

різниці між значенням коефіцієнтів Жаккара окремо для черешні та вишні для взаємодії вірусів СЛЧ – НКП та СЛЧ – ВКС на противагу парі вірусів НКП – ВКС, де різниця між відповідними показниками для цих культур є статистично значущою ($p < 0,001$).

Таблиця 16

Коефіцієнт парної асоціації Жаккара між вірусом СЛЧ та іларвірусами

Культура	Коефіцієнт Жаккара (J)		
	ВСЛЧ vs НКП	ВСЛЧ vs ВКС	ВНКП vs ВКС
Вишня	0,189±0,031	0,027±0,001	0,254±0,0626***
Черешня	0,209±0,029	0,029±0,001	0,076±0,0064***

Примітка. *** – $p \leq 0,001$

Рівень екологічного синергізму між ВНКП та ВКС залежить від генетичних особливостей культури. На рівень коваріації ВСЛЧ з іларвірусами генетичні особливості господарів не вплинули. Це свідчить на користь припущення, що основний шлях трансмісії цього вірусу у вітчизняних насадженнях пов'язаний з кореневою системою. В умовах змін клімату та переведенні садівництва на зрошувані системи утримання насаджень кісточкових культур вірус СЛЧ може отримати додаткові переваги для поширення.

Оцінка рівня тяжіння вірусів до асоціації з іншими вірусами, або до моновірусного інфікування при поширенні. Із застосуванням розробленої в роботі математичної моделі, що базується на використанні теорем про вірогідність незалежних сумісних подій, доведено, що один і той самий вірус у разі поширення може мати як тактику спеціалізації до моновірусної, так і до комплексної інфекції (табл. 17).

Таблиця 17

Оцінка мультівірусного інфікування насаджень кісточкових культур

Культура	Індекс асоціації вірусу (I_{as_k})				Індекс моноекспансії вірусу (I_{me_k})			
	ВСЛЧ	ВШС	ВКС	ВНКП	ВСЛЧ	ВШС	ВКС	ВНКП
Алича	–	0,889	0,114	0,160	–	-0,030	0,644	0,599
Абрикос	–	-0,080	0,041	-0,026	–	0,853	0,741	0,799
Слива	–	0,006	0,430	-0,029	–	0,737	0,281	0,751
Персик	–	0,362	0,345	0,101	–	-0,004	-0,021	0,257
Вишня	0,167	0,101	0,164	0,161	0,129	0,581	0,354	0,309
Черешня	-0,074	0,121	-0,094	0,003	0,019	0,406	0,553	0,458

Запропоновано введення коефіцієнтів асоціативності (I_{as_k}) та моноекспансії (I_{me_k}), які характеризують епідеміологічні тактики вірусів. За використання цих показників продемонстровано різний рівень збалансованості тенденції вірусів до асоціативності та моноекспансії у разі поширення (рис. 19).

Найбільш диверсифікована епідеміологічна поведінка ВШС під час поширення характерна для насаджень вишні та черешні, найменш – для насаджень персика, аличі, сливи та абрикоса. Водночас у насадженнях сливи абрикоса та черешні він має виражену спрямованість до моноінфікування

(рис. 19.В), а в насадженнях персика та аличі – до вираженої асоціативності (рис. 19.С).

Найбільш маніпулятивною є епідеміологічна поведінка ВШС при поширенні в насадженнях вишні та черешні, з огляду на що доцільно ввести його до панелі цільових патогенів у схемах сертифікації цих культур в Україні.

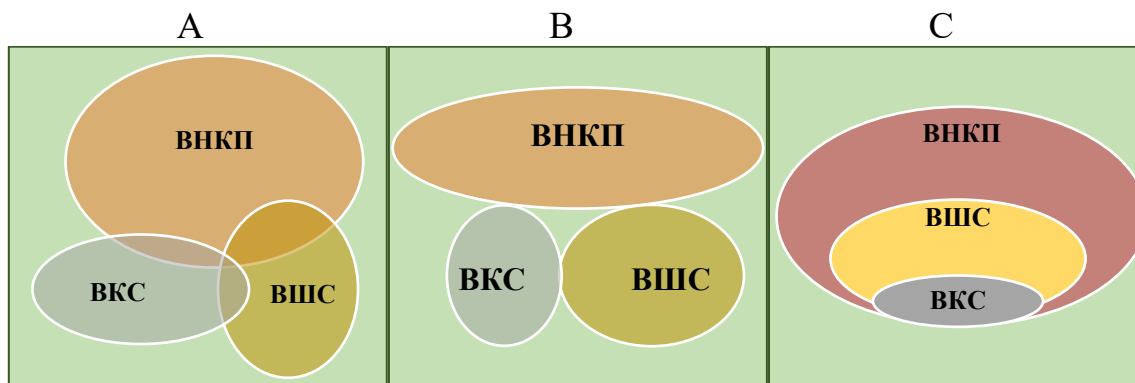


Рис. 19. Тенденції поширення вірусних інфекцій у насадженнях кісточкових культур, обумовлені різним рівнем тяжіння до асоціативного та моновірусного інфікування: А – слабкі індекси асоціації та більш виражене тяжіння до моноекспансії; В – виражене тяжіння до моноекспансії; С – високі рівні індексу асоціації всіх трьох вірусів.

Оцінювання типу біологічної та статистичної взаємодії між трьома основними вірусами при комплексній інфекції. Для з'ясування типів біологічної взаємодії між ВНКП, ВКС і ВШС було застосовано метод Ротмана (Rothman, 2002) (табл. 18). Це дало змогу довести, що епідеміологічна поведінка ВШС є високо диверсифікованою в різних насадженнях кісточкових культур та в різних локальностях. У насадженнях персика в умовах Південного Степу і Криму, аличі в умовах Південного Лісостепу існує причинна синергична взаємодія між іларвірусами ВНКП та ВКС і вірусом шарки сливи, яка може призводити до змін рівня агресивності вірусів. У насадженнях абрикоса у Південному Степу виявлено причинні антагоністичні взаємовідносини між іларвірусами ВКС та ВНКП та вірусом шарки сливи. Адитивний статистичний ефект взаємодії вірусів з тенденцією до мультиплікативного виявлено в насадженнях вишні і черешні у Південному Степу.

Для оцінки типу статистичної взаємодії розраховано показник відносного збільшення ризику внаслідок взаємодії (RERI -the relative excess risk due to interaction), який характеризує збільшення ризику поширення ВШС від розповсюдження ВНКП та ВКС за умови їх взаємодії.

У насадженнях сливи у трьох локальностях епідеміологічна поведінка ВШС є однаковою. Те ж саме стосується насаджень персика. Неузгодженою виявилася поведінка ВШС для аличі, вишні та черешні в різних регіонах. Відносне збільшення ризику (RERI) внаслідок взаємодії двох факторів у персика в обох перевірених насадженнях та в насадженнях аличі в Північному Лісостепу є найвищим. Саме для цих насаджень запропоновано видалення дерев, інфікованих іларвірусами, як превентивний спосіб зупинки поширення ВШС.

Відповідно найнижчий показник – в насадженні абрикоса, де така міра буде неефективною.

Таблиця 18

Типи статистичної та біологічної взаємодії між вірусами ВНКП, ВКС і ВШС у насадженнях кісточкових культур у різних зонах плодівництва

Культура	Зона плодівництва	RERI	Тип біологічної взаємодії	Тип статистичної взаємодії
Персик	Південний Степ	4,37	Причинний синергізм	Мультиплікативний ефект
	Північний Крим	9,46	Причинний синергізм	– ” –
Абрикос	Південний Степ	-8,65	Причинний антагонізм	– ” –
Слива	Північний Лісостеп	-1,27	Нейтралізм	Адитивний ефект
	Південний Лісостеп	-0,530	Нейтралізм	– ” –
	Східний Степ в зоні Донбасу	-0,408	Нейтралізм	– ” –
Алича	Східний Степ	0,684	Нейтралізм	– ” –
	Північний Лісостеп	12,03	Причинний синергізм	Мультиплікативний ефект
Вишня	Східний Степ	-9,5	Антагонізм	Адитивний ефект з вираженою тенденцією до мультиплікативного
	Південний Степ	-0,11	Нейтралізм	Адитивний ефект
Черешня	Східний Степ	-1,8	Нейтралізм, або слабкий антагонізм	Адитивний ефект із слабкою тенденцією до мультиплікативного
	Південний Степ	-0,110	Нейтралізм	Адитивний ефект

ЕКОНОМІЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ ЗАПРОВАДЖЕННЯ В УКРАЇНИ ПРОГРАМИ ВИРОЩУВАННЯ СЕРТИФІКОВАНОГО САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ПЛОДОВИХ КУЛЬТУР

Для оцінювання економічної ефективності запровадження програми вирощування сертифікованого садивного матеріалу в Україні обчислено показник неoderжаного прибутку (втраченої вигоди) виробниками садивного матеріалу та плодової продукції, який є наслідком поширенням вірусних інфекцій. Крім того, такий показник обчислено для споживачів плодової продукції, що демонструє соціальний ефект від зниження її кількості та якості на ринку, спричинених вірусними інфекціями. Розрахунки проведено за методикою, яку побудовано на засадах теорії умовної вірогідності (Sembali et al., 2006). Найвищими виявилися втрати споживачів плодової продукції. За 4 роки вони перевищили 2,6 млрд грн. Загальний рівень неoderжаного прибутку виробників і споживачів в Україні за 2010–2013 рр. становив майже

4 млрд грн. Обчислена сума дає уявлення про фінансові втрати, які щороку несе Україна від використання неякісного садивного матеріалу і відповідно від виробництва неякісної плодової продукції (табл. 19).

Таблиця 19

Неодержаний прибуток в Україні у 2010–2013 рр., пов’язаний з вірусними інфекціями плодових та ягідних культур, тис. грн

Культури	2010	2011	2012	2013	За 4 роки
Зерняткові	237591,5	429246,6	464855,4	597 028,5	1 728 722
Кісточкові	242842,3	333474,9	303819,4	320 274,6	1 200 411
Кущові ягідні	112065,8	181414,5	195033,3	231 033,8	719 547
Суниця	47842,2	69974,5	87624,0	111 237,4	316 678
Всього	640 342	1 014 111	1 051 332	1 259 574	3 965 358

Розрахунки показали, що резерв підвищення економічної ефективності галузі у разі запровадження програми вирощування сертифікованого садивного матеріалу плодових культур на 60 % може бути забезпеченим за рахунок використання високоякісного здорового садивного матеріалу та підтримання його статусу в продуктивних насадженнях саме кісточкових та ягідних культур.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розроблено нові і удосконалено існуючі біотехнологічні процеси для отримання сертифікованого садивного матеріалу кісточкових (вишня, черешня, абрикос, алича, персик, слива), ягідних (суниця, малина, агрус, смородина, ожина та порічки) культур та сформовано концепцію збереження здорового статусу садивного матеріалу упродовж розмноження і експлуатації. Запропоновано збалансовану стратегію проведення консерваційного етапу схем сертифікації цих культур в умовах України.

1. Основними чинниками ефективності відбору рослин-кандидатів у материнські рослини та створення добазових колекцій у кісточкових (48,3 %) і ягідних культур (31 %) є особливості їх сортового складу, який рекомендований для вирощування в Україні. Найнижчу ефективність має виділення рослин-кандидатів сортів абрикоса (36,4 %), персика (37,8 %), малини (8,1 %). Потребують оздоровлення від вірусних інфекцій біотехнологічними методами 20 % протестованих сортів кісточкових та 33 % сортів ягідних культур, занесених до Державного реєстру сортів рослин, придатних для поширення в Україні.

2. Встановлено, що у всіх зонах плодівництва країни переважають віруси, що передаються з пилком під час запилення: в насадженнях кісточкових – ВНКП, ВКС, ягідних – ВККМ, ВКПМ, ВЛКПС. Визначення привабливості (атрактивності) перспективних сортів кісточкових та ягідних культур для колонізації вірусами, що передаються через запилення та векторні організми, є важливим способом оцінювання адаптивного потенціалу сорту в умовах змін клімату. На прикладі насаджень Південного Степу доведено, що найвищим відносним ризиком інфікування ВНКП відзначаються сорти вишні (RR = 2,6) середнього та пізнього строків досягання, сорти абрикоса (RR = 1,4) раннього

та надраннього строків, найвищий ризик інфікування ВШС – сорти персика ($RR = 13,88$) та абрикоса ($RR = 1,4$) середнього та пізнього строків.

3. Селективність вірусів до певних господарів, яку доцільно визначати за індексом селективності ($I_{vs_{ik}}$), сприяє поширенню універсальних вірусів. Найпривабливішими культурами для інфікування ВНКП є персик ($I_{vs_{ik}} = 0,236$), вишня ($I_{vs_{ik}} = 0,049$) та черешня ($I_{vs_{ik}} = 0,082$); для ВКС – вишня ($I_{vs_{ik}} = 0,092$); для ВШС – персик ($I_{vs_{ik}} = 0,145$) та вишня ($I_{vs_{ik}} = 0,081$); для ВКПМ – малина ($I_{vs_{ik}} = 0,407$); для ВЛКПС – суниця ($I_{vs_{ik}} = 0,302$) та малина ($I_{vs_{ik}} = 0,181$); ВМР – малина ($I_{vs_{ik}} = 0,263$); для ВЧКТ – малина ($I_{vs_{ik}} = 0,060$) та суниця ($I_{vs_{ik}} = 0,152$). Серед неповірусів у насадженнях ягідних культур за поширенням переважають ті, у яких диверсифікованіші шляхи трансмісії.

4. Наслідком селективності вірусів є асиметричність їх поширення, яку необхідно враховувати під час планування та закладання насаджень. Принципи просторової ізоляції між маточними та плодовими насадженнями для зниження ризику вірусної реінфекції доцільно базувати на використанні показника відношення шансів інфікування (θ_{ik}). Найжорсткішої просторової ізоляції потребують насадження малини ($\theta_{ik\text{ВКПМ}} = 6,894$), суниці ($\theta_{ik\text{ВЛКПС}} = 4,540$), персика ($\theta_{ik\text{ВНКП}} = 4,224$), вишні ($\theta_{ik\text{ВНКП}} = 1,412$) та черешні ($\theta_{ik\text{ВНКП}} = 1,516$).

5. Виявлення сублімітних доз вірусу НКП за скринінгового тестування матеріалу різних культур методом ІФА має культуроспецифічні особливості. Коригування граничного значення позитивного тесту для оптимізації негативного відношення правдоподібності під час тестування рослинного матеріалу аличі ($-LR = 0,250$), абрикоса ($-LR = 0,000$), черешні ($-LR = 0,167$) та сливи ($-LR = 0,256$) уможливорює підвищення ефективності вилучення рослин з хибно негативними значеннями тесту у маточниках відповідно на 20 %, 13,5, 4,5 та 3,4 %.

6. У колекційно-селекційних і маточних насадженнях кісточкових культур у Східному Степу персистує ізолят ВШС, близький до атипового штаму Вайнона. Коригування операційних характеристик тест-системи для ІФА виробництва Agdia та Loewe забезпечує додаткове вилучення із виробництва 28,4 % інфікованих рослин сливової та 26,2 % вишневої групи при скринінгових тестуваннях.

7. Схеми оздоровлення вірусінфікованих клонів методом хемотерапії в культурі *in vitro* можуть бути уніфікованими і зведеними до послідовного використання каскадного (препарати з вираженим пролонгованим ефектом – рибавірин і СК), чи імпульсного (препарати з сильною дією у швидкій фазі – аміксин) модулів. Для економних схем хемотерапії з мінімальним токсичним впливом на експлантати доцільно застосовувати препарати, дія яких має виражений пролонгований антивірусний ефект.

8. Динаміка змін концентрації вірусних капсидних білків під дією рибавірину та СК відповідає спадній логарифмічній функції. Антивірусна дія рибавірину має виражену фазу пролонгованої дії упродовж чотирьох-п'яти пасажів під час елімінації вірусів ВШС у сливи, ВЧКТ в агрусі та ВКПМ, ВКМ, ВЧКТ і ВЛКПС у малині. Рибавірин має універсальну антивірусну та

культуроспецифічну токсичну дію, зокрема, ефект пригнічення росту експлантатів малини в пізніх субкультурах (XI–XII пасажі).

9. СК має широкий інтервал між терапевтичною та токсичною дозами, низьку сорто- та культуроспецифічність, виражену фазу пролонгованої дії. Подовження тривалості культивування на середовищі з СК має більш універсальну терапевтичну дію. СК виявила стимулювальний вплив на життєздатність експлантатів малини, що стало підставою для розроблення методу їх адаптації до умов *in vivo* за її застосування. Для успішного оздоровлення рослин малини зі змішаною вірусною інфекцією за використання СК критичним є відбір польових рослин з найнижчим титром неповірусів.

10. Для антивірусної дії аміксину на ВСЛЧ, ВЧКТ, ВКПМ, ВККМ і ВЛКПС у експлантатах характерний високий рівень вірус- і сортоспецифічності, максимальна потужність терапевтичної дії у швидкій фазі (до 90 %), низька реалізація антивірусного потенціалу, відсутність вираженої фази пролонгованої дії та вузький інтервал між терапевтичною і токсичною дозами.

11. Підвищення терапевтичних доз рибавіріну (до 100 мг/л) провокує підвищення вірулентності ВКПМ, тому у першій стадії оздоровлення експлантатів малини для запобігання стресовій дії на віруси доцільно застосовувати слабкішу дозу рибавіріну (20–50 мг/л) та підвищувати її на II етапі оздоровлення. Явище підвищення вірулентності характерно також для ВСЛЧ в експлантатах підщепи Гізела 6 у відповідь на обробку СК (40 мг/л) та аміксином (200 мг/л) у процесі тривалого культивування (XI пасажі) після хемотерапевтичного оздоровлення. Цей процес підсилюють фітогормони ІМК та БАП у концентрації 1 мг/л. Терапевтичні дози рибавіріну та СК не викликають мутацій у ділянці генома ВШС штаму Дідерон, що є визначальною для штамової приналежності цього вірусу, та не викликають змін вірулентності вірусів ВЛКПС, ВЧКТ, ВККМ і ВШС.

12. Контроль генетичної ідентичності експлантатів у процесі мікророзмноження та хемотерапії для виявлення соматональних мутацій доцільно проводити за використання іPBS-маркерів. Виявлені випадки генотоксичного ефекту свідчать про геномні перебудови внаслідок переміщення мініатюрних неавтономних транспозонів у відповідь на вплив чинників стресу. Агрус виявився найстресчутливішою серед протестованих культур. Один з мутаційно слабких сайтів в його геномі пов'язаний з транскрипційно активними ділянками гена кукумізину.

13. Встановлено, що основний шлях трансмісії ВСЛЧ у вітчизняних насадженнях пов'язаний з кореневою системою. Методом обмеження його поширення є диверсифікація підщепного матеріалу. Підщепка Гізела 6 проявила чутливість до цього способу інфікування вірусом в умовах культури *in vitro*, тому потребує оптимізації схем садіння в насадженнях із штучним зрошенням.

14. У різних вірусів співвідношення між тенденцією до асоціативності та моноінфікування у разі поширення в насадженнях шести кісточкових культур є неоднаковим. Найдиверсифікованіша епідеміологічна поведінка ВШС у насадженнях вишні ($I_{as_k} = 0,101$, $I_{me_k} = 0,581$) та черешні ($I_{as_k} = 0,121$,

$I_{me_k} = 0,406$), відтак, ВШС доцільно ввести до панелі цільових патогенів у схемах сертифікації цих культур в Україні. Найменш диверсифікована епідеміологічна поведінка ВШС характерна для насаджень персика, аличі, сливи та абрикоса. Водночас у насадженнях сливи ($I_{me_k} = 0,737$) та абрикоса ($I_{me_k} = 0,853$) ВШС під час поширення має чітку спрямованість до моноекспансії, у насадженнях персика ($I_{as_k} = 0,362$) та аличі ($I_{as_k} = 0,889$) – до асоціативності.

15. Превентивні стратегії обмеження поширення ВШС у насадженнях кісточкових культур залежать від типу біологічної взаємодії між вірусами за змішаної вірусної інфекції. Методом обмеження поширення ВШС у насадженнях персика є превентивне вилучення рослин, інфікованих іларвірусами. Аналогічні заходи придатні для боротьби з поширенням ВШС у насадженнях аличі у Північному Лісостепу.

16. На прискорення поширення вірусних інфекцій у насадженнях кісточкових та ягідних культур за змін клімату впливають такі чинники, як спеціалізація універсальних вірусів до диференційованіших екологічних ніш, високий рівень маніпулятивності стратегій поширення основних вірусів і підвищення інцидентності мінорних вірусів.

17. Резерв підвищення економічної ефективності галузі садівництва у разі запровадження Програми вирощування сертифікованого садивного матеріалу плодкових культур на 60 % може бути забезпеченим за рахунок використання оздоровленого садивного матеріалу саме кісточкових та ягідних культур. Негативний соціальний ефект від поширення вірусних інфекцій у насадженнях кісточкових культур за період 2010–2013 рр. на 17 % перевищив відповідний ефект для зерняткових. Неодержаний прибуток розсадницькими господарствами з виробництва садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур від розмноження інфікованих клонів перевищив відповідний показник для розсадників зерняткових культур на 15,8 %.

РЕКОМЕНДАЦІЇ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА

1. Базовий фонд в кількості 165 сортів кісточкових та 54 – ягідних культур для виробництва сертифікованого садивного матеріалу в Україні.

2. Модульні біотехнології хемотерапевтичного оздоровлення експлантатів в культурі *in vitro* за використання аміксину, СК та рибавіріну.

3. Метод адаптації експлантатів малини до умов *in vivo* із застосуванням саліцилової кислоти для підвищення життєздатності та приживлюваності рослин.

4. Метод превентивного запобігання поширенню ВШС у насадженнях 6 кісточкових культур.

5. Спосіб оптимізації дистанцій просторової ізоляції маточних і сертифікованих насаджень кісточкових та ягідних культур від плодоносних насаджень на основі розрахунку показників шансових переваг інфікування (θ_{ik}).

6. Спосіб оцінки атрактивності сорту для інфікування вірусами при сортовипробуваннях за умови використання індексу селективності вірусу до господаря ($I_{vs_{ik}}$).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Васюта С. О. Діагностика вірусів кісточкових культур методом імуноферментного аналізу / С. О. Васюта, **Н. В. Тряпідина** // Садівництво. – 2007. – № 60. – С. 261–266. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*
2. Тряпідина Н. В. Серологічні методи контролю фітовірусологічного статусу садивного матеріалу плодових і ягідних рослин / Н. В. Тряпідина // Наукові праці Південного філіалу «Кримський агротехнологічний університет» Національного аграрного університету. – 2008. – № 107. – С. 170–173.
3. Тряпідина Н. В. Оцінка рівня асоціації між вірусами при мультівірусному інфікуванні насаджень вишні та черешні / Н. В. Тряпідина // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2008. – Вип. 8. – С. 160–167.
4. Фітовірусологічний моніторинг стану насаджень кісточкових культур України / [Кондратенко П. В., **Тряпідина Н. В.**, Васюта С. О., Медведєва Т. В., Супрун К. І., Удовиченко К. М., Удовиченко В. М.] // Вісник аграрної науки. – 2009. – № 6. – С. 22–26. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*
5. Тряпідина Н. В. Оцінка рівня селективності вірусів кісточкових культур до рослинних господарів / Н. В. Тряпідина // Наукові доповіді Національного аграрного університету. – 2009 – № 4 (16). – Режим доступу до журналу: <http://www.nbu.gov.ua/e-Journals/nd/2009-2/10vsootd.pdf>.
6. Тряпідина Н. В. Оцінка рівня моноекспансії та асоціації вірусних інфекцій в насадженнях кісточкових культур України за даними моніторингових обстежень / Н. В. Тряпідина // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2009. – Вип. 10. – С. 166–177.
7. Отримання безвірусних рослин суниці в культурі меристем / [Медведєва Т. В., **Тряпідина Н. В.**, Сидоренко О. В., Удовиченко В. М.] // Наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Кримський агротехнологічний університет». – 2009. – № 127. – С. 187–190. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*
8. Тряпідина Н. В. Оцінка різних типів клонових підщеп черешнево-вишневої групи у вітчизняних насадженнях за рівнем інфікованості вірусами плодових / **Н. В. Тряпідина**, С. О. Васюта // Вісник аграрної науки. – 2010. – № 10. – С. 21–24. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*
9. Тряпідина Н. В. Асоціація іларвірусів в насадженнях кісточкових культур: коваріація та співіснування / Н. В. Тряпідина // Наукові доповіді Національного аграрного університету. – 2010. – № 6 (22). – Режим доступу до журналу: http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2010_6/10kmmpds.pdf.
10. Тряпідина Н. В. Регіональні особливості поширення іларвірусів в насадженнях кісточкових культур України / Н. В. Тряпідина // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2010. – Вип. 11. – С. 132–145.

11. Тряпїцина Н. В. Регіональна нерівномірність поширення вірусу скручування листя черешні в насадженнях вишні та черешні / **Н. В. Тряпїцина**, С. О. Васюта // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2010. – Вип. 12. – С. 130–139. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

12. Медведєва Т. В. Використання саліцилової кислоти для оздоровлення підщепи черешні / Т. В. Медведєва, Р. О. Васильєв, **Н. В. Тряпїцина** // Вісник аграрної науки. – 2011. – № 6 – С. 21–23. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

13. Поширення неповірусів у насадженнях ягідних культур / [**Тряпїцина Н. В.**, Медведєва Т. В., Лушпїган О. П., Супрун К. І.] // Вісник аграрної науки. – 2011. – № 12. – С. 29–32. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

14. Тряпїцина Н. В. Поширення іларвірусів у Південному та Східному Степу України / **Н. В. Тряпїцина**, С. О. Васюта // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2011. – Вип. 13. – С. 137–147. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

15. Використання IRAP маркерів для контролю генетичної стабільності експлантів підщепи Гізела 6 після хемотерапії в культурі *in vitro* / [**Тряпїцина Н. В.**, Кисельов Д. О., Медведєва Т. В., Васильєв Р. О.] // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2011. – Вип. 14. – С. 189–197. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

16. Тряпїцина Н. В. Оцінка різних типів клонових підщеп сливової групи за рівнем інфікованості вірусами плодових / **Н. В. Тряпїцина**, С. О. Васюта // Біоресурси і природокористування. – 2012. – № 1–2. – С. 80–85. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

17. Фітовірусологічний стан колекційних насаджень сливи / [**Тряпїцина Н. В.**, Васюта С. О., Медведєва Т. В., Удовиченко К. М., Супрун К. І., Удовиченко В. М.] // Агроекологічний журнал. – 2012. – № 3. – С. 128–130. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

18. Медведєва Т. В. Вплив гелеутворювачів та інгібіторів етилену на культивування підщепи Гізела 5 в умовах *in vitro* / Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпїцина**, В. Я. Рябий // Вісник аграрної науки. – 2012. – № 11. – С. 43–45. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

19. Оцінка фітовірусологічних ризиків поширення домінуючих вірусів у насадженнях персика / [**Тряпїцина Н. В.**, Васюта С. О., Медведєва Т. В., Супрун К. І.] // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Агрономія. – 2012. – Вип. 180. – С. 225–234. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

20. Тряпїцина Н. В. Адитивний вплив віку насаджень та строків дозрівання сортів абрикоса (*Prunus armeniaca*) на поширення іларвірусів / **Н. В. Тряпїцина**, С. О. Васюта, Л. І. Дунаєва // Садівництво. – 2012. – № 66. – С. 330–337. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

21. Тряпїцина Н. В. Метод контролю концентрації покривного білка вірусів на різних етапах хемотерапії в культурі *in vitro* / **Н. В. Тряпїцина**, Т. В. Медведєва // Садівництво. – 2012. – № 65. – С. 216–222. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

22. Медведєва Т. В. Дослідження з мікроклонального розмноження клонових підщеп черешні / Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпїцина**, В. Я. Рябий // Збірник наукових праць Інституту біоенергетичних культур і цукрових буряків НААН. – 2012. – № 16. – С. 268–271. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

23. Віруси, що домінують у насадженнях кущових ягідних культур / [Тряпїцина Н. В., Медведєва Т. В., Ярещенко О. М., Удовиченко К. М., Лушпиган О. П., Супрун К. І.] // Садівництво. – 2013. – № 67. – С. 193–203. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

24. Тряпїцина Н. В. Основні фітовірусологічні ризики в насадженнях малини та способи їх попередження / **Н. В. Тряпїцина**, Т. В. Медведєва, О. П. Лушпиган // Вісник аграрної науки. – 2013. – № 5. – С. 27–30. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

25. Медведєва Т. В. Мікроклональне розмноження підщепи вишня Студениківська / Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпїцина**, В. Я. Рябий // Вісник аграрної науки. – 2014. – № 04. – С. 36–39. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

Стаття у науковому виданні України, включеному до міжнародних наукометричних баз даних

26. Тряпїцина Н. В. Вплив хемотерапії на складні вірусні патокомплекси в експлантах малини / Н. В. Тряпїцина, Т. В. Медведєва // Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – № 6 (48). – Режим доступу до журналу: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/Nd/2014>. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

Статті у наукових виданнях інших держав:

27. Тряпїцина Н. В. Оценка уровня селективности неовирусом к ягодным культурам / Н. В. Тряпїцина // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – № 36. – С. 255–261.

28. Тряпїцина Н. В. Хемотерапия крыжовника в условиях культуры *in vitro* / **Н. В. Тряпїцина**, Т. В. Медведєва // Плодоводство и ягодоводство

России. – 2014. – № 38 (2). – С. 177–183. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

29. Тряпицына Н. В. Особенности эпидемиологического поведения вируса шарки сливы в насаждениях персика и абрикоса / Н. В. Тряпицына // Плодоводство и ягодоводство России. – 2014. – № 40 (1). – С. 325–328.

30. Оценка возможных генетических изменений в эксплантах сливы и в гене поверхностного белка ВШС после хемотерапии / [Тряпицына Н. В., Медведева Т. В., Удовиченко Е. Н., Проданюк Л. Н.] // Информационный бюллетень ВПРС МОББ. – 2015. – № 47. – С. 159–163. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

Статті в інших виданнях

31. Тряпицына Н. В. Особенности поширення іларвірусів в насадженнях кісточкових культур Східного Степу в зоні Донбасу / Н. В. Тряпицына // Агроєкологічний журнал. – 2010. – Спецвипуск. – С. 218–221.

32. Медведева Т. В. Елімінація вірусу кущистої карликовості малини методом хемотерапії в культурі *in vitro* / Т. В. Медведева, **Н. В. Тряпицына** // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2010. – Т. 9. – С. 178–186. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

33. Тряпицына Н. В. Неповірус скручування листя черешні: тенденції до співіснування з іларвірусами / **Н. В. Тряпицына**, С. О. Васюта, Т. В. Медведева // Агроєкологічний журнал. – 2011. – Спецвипуск. – С. 222–224. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

34. Медведева Т. В. Оздоровлення підщепи Гізела 6 від вірусу скручування листя черешні / Т. В. Медведева, Р. О. Васильєв, **Н. В. Тряпицына** // Фактори експериментальної еволюції організмів. – 2011. – Т. 10. – С. 224–227. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

35. Evaluating commercially available serological diagnostic tests for the detection of ukrainian isolates of *Plum pox virus* / [Тряпицына Н. В., Udovychenko K. M., Vasyuta S. O., Medvedyeva T. V., Yarushnikov V. V., Udovychenko V. M.] // Microbiology & Biotechnology. – 2013. – № 1 (21). – P. 89–98. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

36. Медведева Т. В. Оздоровлення садивного матеріалу малини від комплексу хвороб та розмножування в культурі тканин / Т. В. Медведева, **Н. В. Тряпицына** // Вітчизняні технології виробництва, зберігання та переробки плодів і ягід в Україні. – 2012. – С. 38–40. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).*

37. Вирощування безвірусного матеріалу вегетативно розмножуваних підщеп зерняткових та кісточкових культур / [Удовиченко В. М., Васюта С. О., **Тряпицына Н. В.**, Медведева Т. В., Удовиченко К. М.] // Вітчизняні технології виробництва, зберігання та переробки плодів і ягід в Україні. – 2012. – С. 24.–27.

(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано статтю).

Тези наукових доповідей:

38. Вірусні хвороби плодових порід в Україні / [Удовиченко В. М., **Тряпціна Н. В.**, Васюта С. О., Малієнко В. А., Таранухо М. П., Удовиченко К. М., Господарик А. В., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П.] // Біоресурси та віруси: IV Міжнародна конференція, м. Київ, 27–30 вересня 2004 року: тези доповіді. – К., 2004. – С. 98–99. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

39. Вірус шарки сливи в насадженнях кісточкових культур України / [Удовиченко В. М., Васюта С. О., **Тряпціна Н. В.**, Таранухо М. П., Удовиченко К. М., Супрун К. І.] // Біоресурси та віруси: V Міжнародна конференція, м. Київ, 10–13 вересня 2007 року: тези доповіді. – К., 2007. – С. 204. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

40. Virus diseases of fruit crops in Ukraine / [Udovychenko V. M., **Тряпціна Н. В.**, Vasyuta S. O., Medvedeva T. V., Maliyenko V. A., Udovychenko K. M., Kondratenko P. V.] // Controlling epidemics of emerging and established plant virus diseases – the way forward: X International Plant Virus Epidemiology Symposium, Hyderabad, 15–19 October 2007: book of abstracts. – Hyderabad, India, 2007. – P. 111. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

41. Оздоровлення садивного матеріалу суниці біотехнологічними методами / [Медведева Т. В., **Тряпціна Н. В.**, Сидоренко О. В., Удовиченко В. М.] // Проблеми адаптації та розвитку ягідництва: Всеукраїнська наукова конференція молодих вчених і спеціалістів, м. Київ, 8–10 грудня 2008 року: тези доповіді. – К., 2008. – С. 81–83. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

42. Вірус шарки сливи в Україні / [Васюта С. А., **Тряпціна Н. В.**, Таранухо М. П., Удовиченко В. М.] // Интегрированная защита садов и виноградников: Международная научно-практическая конференция, г. Одесса, 8–13 сентября 2008 года: тезисы доклада. – Одесса, 2008. – С. 88–92. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

43. Васюта С. А. Мониторинг вирусных болезней косточковых культур в Украине / С. А. Васюта, **Н. В. Тряпціна** // Информационные системы диагностики, мониторинга и прогноза важнейших сорных растений, вредителей и болезней сельскохозяйственных культур: Международная конференция, г. Санкт-Петербург, 12–16 мая 2008 года: тезисы доклада. – СПб, 2008. – С. 102–103. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

44. Оцінка фітовірусологічного стану насаджень кісточкових культур України / [**Тряпціна Н. В.**, Васюта С. О., Медведева Т. В., Супрун К. І., Удовиченко К. М., Удовиченко В. М., Кондратенко П. В.] // XII з'їзд товариства

мікробіологів України ім. С. М. Вернадського, м. Ужгород, 25–30 травня 2009 року: тези доповіді. – Ужгород, 2009. – С. 470. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

45. Медведєва Т. В. Хемотерапія вірусу карликовості малини в умовах культури верхівкової меристеми / Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпціна**, В. М. Удовиченко // Екотрофологія, аспекти продовольчої та харчової безпеки: III Міжнародна науково-практична конференція, м. Біла Церква, 17–18 вересня 2009 року: тези доповіді. – Біла Церква, 2009. – С. 33–35. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

46. Розробка ефективних прийомів отримання асептичної культури *in vitro* підщеп черешні / [Васильєв Р. О., Удовиченко К. М., **Тряпціна Н. В.**, Удовиченко В. М.] // Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин та біобезпека: Міжнародна науково-практична конференція, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. – Одеса, 2010. – С. 79. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

47. Удовиченко К. М. Оптимізована система контролю зворотної транскрипції рослинної РНК / К. М. Удовиченко, **Н. В. Тряпціна** // Молодь і поступ біології: VI Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, м. Львів, 21–24 вересня 2010 року: тези доповіді. – Львів, 2010. – С. 173–174. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

48. Медведєва Т. В. Оцінка фітовірусологічного стану та оздоровлення садивного матеріалу рослин роду *Rubus* / Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпціна**, К. І. Супрун // Біоресурси та віруси: VI Міжнародна конференція, м. Київ, 14–17 вересня 2010 року: тези доповіді. – Київ, 2010. – С. 226. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

49. Вплив режимів стерилізації на приживлюваність експлантів підщеп вишні та черешні / [Васильєв Р. О., Удовиченко К. М., **Тряпціна Н. В.**, Удовиченко В. М.] // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: VII наукова конференція молодих вчених, м. Чернігів, 21–24 вересня 2010 року: тези доповіді. – Чернігів, 2010. – С. 102–103. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

50. Тряпціна Н. В. Оцінка рівня селективності іларвірусів до кісточкових культур в умовах Північного Лісостепу / Н. В. Тряпціна // Інтродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках: Міжнародна наукова конференція, м. Київ, 15–17 вересня 2010 року: тези доповіді. – К., 2010. – С. 554–556.

51. Супрун К. І. Оцінка фітовірусологічного стану маточних насаджень ожини / К. І. Супрун, **Н. В. Тряпціна** // Фітосанітарна безпека та біоекологія застосування пестицидів: Всеукраїнська конференція, м. Чернівці, 14–17 вересня 2010 року: тези доповіді. – Чернівці, 2010. – С. 261–263. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

52. Васильєв Р. О. Використання саліцилової кислоти для оздоровлення підщепи черешні / Р. О. Васильєв, Т. В. Медведєва, **Н. В. Тряпїцина** // Современная биология растений: Международная научная конференция, посвященная 65-летию основания ЮНЕСКО, 340-летию становления анатомии растений и 145-летию выхода работы основоположника генетики Г. Менделя «Опыты над растительными гибридами», 100-летию основания гербария Луганского НАУ, г. Луганск, 20–24 июня 2011 года: тезисы доклада. – Луганск, 2011. – С. 116–118. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

53. Тряпїцина Н. В. Вплив віку насаджень та термінів дозрівання на поширення вірусу шарки сливи в насадженнях абрикоса в умовах південного Степу / **Н. В. Тряпїцина**, С. О. Васюта, Л. І. Дунаєва // Стан і перспективи формування сортових рослинних ресурсів в Україні: Перша міжнародна науково-практична конференція, м. Київ, 11–13 липня 2012 року: тези доповіді. – К., 2012. – С. 276–277. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

54. Екологічна асоціація між домінуючими вірусами в насадженнях кісточкових культур / [**Тряпїцина Н. В.**, Васюта С. А., Медведєва Т. В., Удовиченко Е. Н., Супрун Е. І., Удовиченко В. М.] // Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві: VIII наукова конференція молодих вчених, м. Чернігів, 25–27 вересня 2012 року: тези доповіді. – Чернігів, 2012. – С. 94–97. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження та їх узагальнення, написано тези доповіді).*

55. Тряпїцина Н. В. Факторы, влияющие на распространение вирусов в насаждениях вишни / Н. В. Тряпїцина // Актуальные проблемы агропромышленного производства: Международная научно-практическая конференция, г. Курск, Российская Федерация, 23–25 января 2013 года: тезисы доклада. – Курск, 2013. – С. 147–151.

Національні стандарти:

56. Культури плодів та ягідні. Методи визначення фітовірусологічного статусу садивного матеріалу кущових ягідних культур: ДСТУ 7185:2010. – [Чинний від 2011-01-07]. – К.: Держспоживстандарт України, 2011. – 9 с. – (Національні стандарти України).

57. Культури плодів та ягідні. Методи визначення фітовірусологічного статусу садивного матеріалу суниці: ДСТУ 7186:2010. – [Чинний від 2011-01-07]. – К.: Держспоживстандарт України, 2011. – 10 с. – (Національні стандарти України).

58. Культури плодів та ягідні. Методи оздоровлення садивного матеріалу від вірусних та вірусоподібних інфекцій: ДСТУ 7184:2010: – [Чинний від 2011-01-07]. – К.: Держспоживстандарт України, 2011. – 7 с. – (Національні стандарти України).

Методичні рекомендації:

59. Тряпціна Н. В. Методи експрес-діагностики та основного тестування кісточкових культур на наявність прихованої вірусної інфекції: [методичні рекомендації] / **Н. В. Тряпціна**, Т. В. Медведєва, Н. В. Шевчук // Методичні вказівки до вивчення курсу «Прогресивні технології в розсадництві» студентами, які навчаються за освітньо-кваліфікаційною програмою магістрів зі спеціальності «плодо-овочівництво і виноградарство» – К.: Видавничий центр НУБіП, 2015. – 44 с. (*Здобувачеві належить ідея, розробка, узагальнення експериментальних та теоретичних даних, написання рекомендацій*).

60. Тряпціна Н. В. Мінімізація фітовірусологічних ризиків у насадженнях малини (*Rubus idaeus L.*): [методичні рекомендації] / **Н. В. Тряпціна**, Т. В. Медведєва, К. І. Супрун. – К.: Видавничий центр НУБіП, 2015. – 23 с. (*Здобувачеві належить ідея, розробка, узагальнення експериментальних та теоретичних даних, написання рекомендацій*).

61. Тряпціна Н. В. Сертифікація садивного матеріалу малини, ожини та їх гібридів: [методичні рекомендації] / **Н. В. Тряпціна**, Т. В. Медведєва, К. М. Удовиченко. – К.: Видавничий центр НУБіП, 2015. – 21 с. (*Здобувачеві належить ідея, розробка, узагальнення експериментальних та теоретичних даних, написання рекомендацій*).

АНОТАЦІЯ

Тряпціна Н. В. Біотехнологічні основи отримання садивного матеріалу кісточкових (*Prunus spp.*) та ягідних (*Ribes spp.*, *Rubus spp.*, *Fragaria x ananassa*) культур в Україні. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора сільськогосподарських наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2016.

Дисертацію присвячено розробленню нових і вдосконаленню існуючих біотехнологій, спрямованих на підвищення ефективності виробництва сертифікованого садивного матеріалу шести кісточкових та шести ягідних культур. Обґрунтовано науково-методичну основу забезпечення здорового статусу садивного матеріалу на всіх етапах його виробництва та експлуатації. Вдосконалено біотехнології відбору рослин-кандидатів у материнські рослини та підтримання статусу рослин в добазових колекціях в умовах культури *in vitro* та в умовах відкритого ґрунту. Актуалізовано панелі вірусних патогенів для сертифікації садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур в умовах України. Визначено основні критерії універсалізації біотехнологій хемотерапевтичного оздоровлення, що базуються на оцінюванні фази швидкої та пролонгованої дії препарату, діапазону терапевтичних та токсичних доз. Розроблено універсальні (імпульсні та каскадні) модулі хемотерапевтичного оздоровлення в культурі *in vitro* експлантатів малини, агрусу, сливи та підщепи Гізела 6 від моно- та полівірусних інфекцій. Створено методичний алгоритм оцінювання терапевтичного, токсичного та генотоксичного ефектів дії антивірусних препаратів під час проведення оздоровлення.

Запропоновано систему прогнозних оцінок асиметричності поширення вірусів кісточкових та ягідних культур у садових агроценозах, яка базується на визначенні тенденцій до коваріювання, асоціативності та моноінфікування вірусів під час розповсюдження. Оцінено стратегії поширення ВШС у насадженнях різних кісточкових культур та виділено чинники, які можуть на них впливати. Науково обґрунтовано та розроблено превентивні заходи з обмеження поширення ВШС у насадженнях шести кісточкових культур.

Обчислено економічні та соціальні ефекти запровадження програми вирощування сертифікованого садивного матеріалу кісточкових та ягідних культур в Україні.

Ключові слова: антивірусні сполуки, біотехнології, генетична ідентичність, кісточкові культури, культура *in vitro*, моно- і мультівірусні інфекції, оздоровлення, сертифікований садивний матеріал, схема сертифікації, хемотерапія, ягідні культури.

АННОТАЦІЯ

Тряпицына Н. В. Биотехнологические основы получения посадочного материала косточковых (*Prunus* spp.) и ягодных (*Ribes* spp., *Rubus* spp., *Fragaria* x *ananassa*) культур в Украине. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2016.

Диссертация посвящена разработке новых и совершенствованию существующих биотехнологий выращивания оздоровленного посадочного материала шести косточковых и шести ягодных культур. Создана целостная концепция обеспечения его здорового статуса на всех этапах производства и эксплуатации, учитывающая природно-климатические условия Украины, особенности сортового состава культур, спектр вирусных инфекций и характер взаимосвязей между вирусами и хозяевами.

Усовершенствованы биотехнологии отбора растений-кандидатов в материнские растения и поддержания их фитовирусологического статуса в добазовых коллекциях в условиях культуры *in vitro* и в условиях открытого грунта.

Оптимизировано скрининговое тестирования методом ИФА для выявления локальных изолятов вируса некротической кольцевой пятнистости и вируса шарки сливы. Актуализированы панели вирусных патогенов для сертификации посадочного материала черешни и вишни в условиях Украины. Обоснована целесообразность усовершенствования сортоиспытания на признак аттрактивности сортов к инфицированию вирусами. Рассчитаны дополнительные популяционные риски инфицирования сортов вишни, черешни, абрикоса и персика различных сроков созревания основными вирусами в условиях Южной Степи. Сформулирована и экспериментально подтверждена концепция селективности универсальных вирусов к растительным хозяевам (сортам, культурам) как успешной тактики при их распространении. Предложен метод расчета индекса селективности вируса, как элемента учета при

сортоиспытаниях, и способ оптимизации дистанций пространственной изоляции маточников от плодоносных насаждений, основывающийся на расчёте показателя отношения шансов инфицирования вирусом определенного хозяина.

Определены основные критерии универсализации биотехнологий хемотерапевтического оздоровления, основанные на оценке фазы быстрого и пролонгированного действия антивирусного препарата, диапазона терапевтических и токсических доз, продолжительности культивирования эксплантатов на среде с антивирусным препаратом. Создан методический алгоритм оценки терапевтического, токсического и генотоксического эффектов действия вироцидов при проведении оздоровления методом хемотерапии в культуре *in vitro*. Разработана система количественной оценки изменений концентрации вирусов в процессе хемотерапевтического оздоровления, которая позволяет проводить его аппроксимацию.

Разработаны универсальные импульсные и каскадные модули биотехнологий хемотерапевтического оздоровления в культуре *in vitro* для эксплантатов малины, крыжовника, сливы и подвоя Гизела 6 от моно- и мультивирусных инфекций. Определена динамика изменений концентрации вирусных капсидных белков в эксплантатах косточковых и ягодных культур в ответ на действие трех антивирусных препаратов – рибавирина, салициловой кислоты и амиксина. Оценены их дозозависимый эффект и эффект продолжительности действия на примере различных сортов и культур. Охарактеризовано влияние компонентов культуральных сред на антивирусную активность вироцидов. Выделены наиболее успешные варианты оздоровления при последовательном использовании различных вироцидов.

Оценены изменения жизнеспособности эксплантатов под влиянием антивирусных препаратов на различных этапах оздоровления. Выявлены случаи угнетения ростовой активности культуральных растений на поздних раундах культивирования после обработки рибавирином и амиксином и положительный эффект влияния салициловой кислоты на жизнеспособность эксплантатов малины. Разработана методика адаптации к условиям *in vivo* и методика предхемотерапевтической обработки эксплантатов малины с использованием салициловой кислоты для повышения их жизнеспособности.

Установлены случаи повышения уровня вирулентности вирусов после хемотерапевтического оздоровления в культуре *in vitro*. Выявлено стимулирующее влияние на этот процесс фитогормонов БАП и ИМК, а также высоких доз рибавирина. Выделены оптимальные терапевтические дозы этого препарата для предупреждения изменений вирулентности вирусов при последовательных хемотерапевтических обработках эксплантатов малины со смешанной вирусной инфекцией.

Подобраны эффективные маркерные системы для контроля генотоксических эффектов в процессе микроклонирования и оздоровления эксплантатов. Экспериментально доказано, что проблема генетической нестабильности напрямую связана с активностью мобильных генетических элементов в транскрипционно активных участках генома растения.

Предложена система прогнозных оценок асимметричного распространения вирусов, основанная на выявлении их тенденций к ковариации, ассоциативности и моноинфицированию хозяев. Научно обоснованы и разработаны превентивные меры по ограничению распространения ВШС в насаждениях шести косточковых культур.

На основе обобщения экспериментального материала даны прогнозы возможных изменений вирулентности, трансмиссивности и инцидентности вирусов в насаждениях косточковых и ягодных культур в условиях климатических изменений.

Рассчитаны экономические и социальные эффекты внедрения программы выращивания сертифицированного посадочного материала косточковых и ягодных культур в Украине.

Ключевые слова: противовирусные соединения, биотехнологии, генетическая идентичность, косточковые культуры, культура *in vitro*, моно- и поливирусные инфекции, оздоровление, сертифицированный посадочный материал, схема сертификации, хемотерапия, ягодные культуры.

ANNOTATION

Triapitsyna N. V. Biotechnological bases of planting material obtaining for stone fruit (*Prunus* spp.) and berries (*Ribes* spp., *Rubus* spp., *Fragaria* x *ananassa*) crops in Ukraine. – The Manuscript.

The thesis for the scientific degree of Doctor of Agricultural Sciences in specialty 03.00.20 – Biotechnology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kiev, 2016.

The thesis is devoted to the development of new biotechnologies and improvement of existing ones for production of healthy planting material for six stone and six berries crops. It was created the holistic concept for providing of healthy status of planting stock material at all steps of its production and operation.

The biotechnologies for screening of candidate material for nuclear stock status and maintenance of healthy plant status in prebasic collections *in vitro* culture conditions and in open field conditions were improved. The panels of viral pathogens for the certification of planting material of stone fruit and berry crops were updated to condition of Ukraine. The main criteria for universalization of chemotherapeutic biotechnologies, based on evaluation of rapid and prolonged phase of drug action and range between therapeutic and toxic doses were identified.

The universal units («pulse» and «cascade») of chemotherapy biotechnologies *in vitro* culture for raspberry, gooseberry, plum, rootstock Gisela 6 explants sanitation from mono- and multivirus infections were designed. The methodical algorithm for estimating of therapeutic, toxic and genotoxic effects of antiviral drugs during the explants chemotherapy *in vitro* culture was created.

The predictive evaluation system of asymmetric viruses distribution based on determining of theirs tendencies for co-variation, association and monoexpansion was proposed. The epidemiological strategies of PPV distribution in plantations of different stone fruits crops and the main factors that can influence them were

evaluated. The preventive measures to avoid the PPV spread in orchards were scientifically proved and developed for six stone fruit crops.

The economical and social effects of the implementation of the program of high-quality certified plant material production of stone fruit and berry crops in Ukraine were calculated.

Key words: antiviral compounds, berry crops, biotechnologies, chemotherapy, certified planting material, certification scheme, genetic identity, health sanitation, *in vitro* culture, mono- and multi virus infections, stone fruit crops.