НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ПОГОДЖЕННО
Декан факультету/ДиректорННІ
_____Юлія КЛОМІЄЦЬ
«___»_____2026р

ДОПУСКАЄТЬСЯ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики
_____Світлана ПРИЛУЦЬКА
«____» _____2026 р.

БАКАЛАВРСЬКА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: «Активність каталази та вміст фотосинтетичних пігментів у півоніях »

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»
(код і назва)

Гарант освітньої програми
Кандидат біологічних наук,
доцент кафедри
екобіотехнології
та біорізноманіття _____ **Олена КВАСКО**
(підпис)

Керівник бакалаврської кваліфікаційної роботи
Кандидат
сільськогосподарських наук,
доцент кафедри фізіології,
біохімії рослин та біоенергетики _____ **Анна ДАЩЕНКО**
(підпис)

Виконала _____ **Поліна ЯЦИНА**
(підпис)

КИЇВ-2026

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
БІОРЕСУРСІВ І
ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Факультет захисту рослин, біотехнологій та екології

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри
фізіології, біохімії рослин та
біоенергетики
_____Світлана ПРИЛУЦЬКА
«____» _____2026 р.

З А В Д А Н Н Я
на виконання бакалаврської кваліфікаційної роботи студентці

Спеціальність 162 Біотехнології та біоінженерія

Тема бакалаврської роботи: «Виявлення вірусних хвороб на півонії (paeonia spp) які впливають на її декоративну цінність» затверджена наказом ректора НУБіП України від "22" жовтня 2025 р. № 1880 "С".

Термін подання завершеної роботи на кафедру 20 травня 2025 року

Вихідні дані до роботи: сорти півоній: Mr. G. F. Hamerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Casablanca, Lorelei, Полонез, Медярочка, методики для визначення активності каталази та пігментів, список літератури, протокол для проведення ІФА.

Перелік питань, які потрібно розробити:

1. Огляд літератури, збір інформації та рослинного матеріалу на базі Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України.
2. Підбір сортів, які мають контроль та хвору рослину.
3. Підготовка реактивів для проведення ІФА та для активності каталази, і фотосинтетичних пігментів.
4. Написання дипломної роботи.

Дата видачі завдання 1 червня 2025 р.

Керівник бакалаврської
кваліфікаційної роботи _____ **Анна ДАЩЕНКО**
(підпис)

Завдання прийняла до виконання _____ **Поліна ЯЦИНА**
(підпис)

РЕФЕРАТ

Курсова робота викладена на ’52’ сторінках друкованого тексту. Вона містить вступ, три розділи, висновки, список використаних джерел та додатки. Робота ілюстрована ’17’ рисунками та ’7’ таблицями. Список літератури включає ’27’ найменувань.

У роботі представлено результати фітопатологічного моніторингу насаджень півонії, методику візуальної діагностики вірусних захворювань та результати серологічного аналізу (DAS-ELISA). Зразки півоній тестувалися на наявність 11 вірусів. Додатково проведено тестування зразків бузини (Sambucus nigra) на наявність вірусу кільцевої плямистості вишні (CLRV). Результати досліджень узагальнено у вигляді таблиць та фотоматеріалів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ПІВОНІЯ, ВІРУСНІ ХВОРОБИ, ДЕКОРАТИВНА ЦІННІСТЬ, ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ, DAS-ELISA, ФІТОПАТОЛОГІЧНИЙ МОНІТОРИНГ, ДІАГНОСТИКА ВІРУСІВ, ВІРУС КІЛЬЦЕВОЇ ПЛЯМИСТОСТІ ВИШНІ, БУЗИНА ЧОРНА, СИМПТОМИ УРАЖЕННЯ.

Мета дослідження - виявити та ідентифікувати збудників вірусних хвороб на рослинах роду Paeonia spp. за допомогою методу ІФА та встановити ступінь їхнього впливу на втрату декоративної цінності досліджуваних сортів: Mr. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei, Casablanca, Полонез, Медярочка.

Завдання дослідження:

– здійснити аналіз наукової літератури щодо поширення, симптоматики та шкідливості вірусів півонії, а також ознайомитись з колекцією квітниково-декоративних рослин у Національному ботанічному саду імені М.М. Гришка НАН України;

– провести візуальну оцінку стану рослин та відібрати зразки з ознаками вірусного ураження для лабораторного аналізу;

– здійснити діагностику відібраних зразків методом імуноферментного аналізу (DAS-ELISA) для ідентифікації специфічних вірусів.

Об'єкти дослідження: рослини півоній (*Paeonia spp.*): M*r. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei, Casablanca*, Полонез, Медярочка; а також зразки бузини чорної (*Sambucus nigra L.*).

Предмет дослідження: виявлення специфічних вірусних антигенів у тканинах півоній та бузини методом DAS-ELISA та оцінка ступеня втрати декоративності досліджуваних рослин.

Результати досліджень:

– методом DAS-ELISA проведено тестування 9 сортів півоній на наявність 11 вірусів (CLRV, TRV, PeAMV, RRSV, GLRaV-1, GLRaV-3, TNV, GLRaV-7, GFLV, TRSV, TBRV). Жоден з тестованих вірусів не було виявлено у зразках півоній, що свідчить про необхідність розширення панелі діагностики або застосування молекулярних методів (RT-PCR, NGS);

– у зразках бузини (*Sambucus nigra*) виявлено вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV) у 10 з 13 зразків, що підтвердило валідність тест-системи та широке поширення CLRV серед бузини в Україні;

– візуальне обстеження 9 сортів півоній виявило симптоми, характерні для вірусного ураження: кільцеву плямистість, деформацію листя, нетипову морфологію листкових пластин.

ABSTRACT

The course work is presented on ’52’ pages of printed text. It contains an introduction, three chapters, conclusions, a list of sources used and appendices. The work is illustrated by ’17’ figures and ’7’ tables. The list of references includes ’27’ titles.

The work presents the results of phytopathological monitoring of peony plantations, the method of visual diagnosis of viral diseases and the results of serological analysis (DAS-ELISA). Peony samples were tested for the presence of

11 viruses. Additionally, elderberry samples (Sambucus nigra) were tested for the presence of cherry ringspot virus (CLRV). The results of the research are summarized in the form of tables and photographs.

KEYWORDS: PEONY, VIRAL DISEASES, DECORATIVE VALUE, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, DAS-ELISA, PHYTOPATHOLOGICAL MONITORING, VIRUS DIAGNOSIS, CHERRY LEAF ROLL VIRUS, BLACK ELDERBERRY, INFECTION SYMPTOMS.

The purpose of the research is to detect and identify pathogens of viral diseases on plants of the genus Paeonia spp. using the ELISA method and to establish the degree of their influence on the loss of decorative value of the studied varieties: Mr. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei, Casablanca, Polonaise, Medyarochka.

Research objectives:

– to analyze the scientific literature on the spread, symptoms and harmfulness of peony viruses, as well as to familiarize yourself with the collection of flower and ornamental plants in the National Botanical Garden named after M.M. Grishko of the NAS of Ukraine;

– to conduct a visual assessment of the condition of plants and select samples with signs of viral damage for laboratory analysis;

– to diagnose the selected samples by enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) to identify specific viruses.

Research objects: peony plants (Paeonia spp.): Mr. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei, Casablanca, Polonaise, Medyarochka; as well as samples of black elderberry (Sambucus nigra L.).

Subject of the study: detection of specific viral antigens in the tissues of peonies and elderberry by the DAS-ELISA method and assessment of the degree of loss of decorativeness of the studied plants.

Research results:

– 9 varieties of peonies were tested for the presence of 11 viruses (CLRV, TRV, PeAMV, RRSV, GLRaV-1, GLRaV-3, TNV, GLRaV-7, GFLV, TRSV, TBRV) by the DAS-ELISA method. None of the tested viruses was detected in peony samples, which indicates the need to expand the diagnostic panel or use molecular methods (RT-PCR, NGS);

– in elderberry samples (Sambucus nigra), cherry ringspot virus (CLRV) was detected in 10 out of 13 samples, which confirmed the validity of the test system and the wide distribution of CLRV among elderberries in Ukraine;

– visual examination of 9 varieties of peonies revealed symptoms characteristic of viral infection: ring spot, leaf deformation, atypical morphology of leaf blades.

ЗМІСТ

ЗМІСТ 6
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ 7
ВСТУП 8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 10
1.1. Ботаніко-біологічна характеристика роду *Paeonia L.* 10
1.1.1. Систематичне положення та загальна характеристика роду 10
1.1.2. Морфологічні та біологічні особливості 11
1.1.3. Екологічні вимоги до культивування 14
1.1.4. Культурне та економічне значення 14
1.2. Колекція півоній НБС імені М.М. Гришка НАН України 16
1.3. Вірусні захворювання півоній 17
1.3.1. Загальна характеристика вірусних хвороб півоній 17
1.3.2. Основні вірусні збудники 17
1.3.3. Вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV) 20
1.3.4. Шляхи передачі та поширення вірусів 21
1.4. Методи діагностики вірусів рослин 22
1.4.1. Візуальна діагностика 22
1.4.2. Серологічні методи. DAS-ELISA 22
1.4.3. Молекулярні методи діагностики 23
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 25
2.1. Об’єкти дослідження 25
2.1.1. Досліджувані сорти півоній 25
2.1.2. Додаткові зразки для аналізу 31
2.2. Методи дослідження 32
2.2.1. Візуальне обстеження 32
2.2.2. Імуноферментний аналіз (DAS-ELISA) 32
2.2.3. Реєстрація та інтерпретація результатів 35
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ 37
3.1. Результати візуального обстеження 37
3.2. Результати DAS-ELISA 38
3.2.1. Результати тестування півоній 38
3.2.2. Результати тестування бузини на CLRV 40
3.3. Обговорення результатів 41
ВИСНОВКИ 45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 47

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

TRV - вірус брязкальця тютюну (*Tobacco rattle virus*)

TSWV - вірус плямистого в'янення томатів (*Tomato spotted wilt virus*)

AMV - вірус мозаїки люцерни (*Alfalfa mosaic virus*)

CMV - вірус огіркової мозаїки (*Cucumber mosaic virus*)

CLRV - вірус кільцевої плямистості вишні (*Cherry leaf roll virus*)

CNSV - вірус некротичної затримки росту цикасів (*Cycas necrotic stunt virus*)

GLRaV-1 - вірус згортання листя виноградної лози 1 серотипу (*Grapevine leafroll-associated virus 1*)

GLRaV-3 - вірус згортання листя виноградної лози 3 серотипу (*Grapevine leafroll-associated virus 3*)

GLRaV-7 - вірус згортання листя виноградної лози 7 серотипу (*Grapevine leafroll-associated virus 7*)

GFLV - вірус віялкового листя виноградної лози (*Grapevine fanleaf virus*)

TNV - вірус некрозу тютюну (*Tobacco necrosis virus*)

PeAMV - вірус астероїдної мозаїки петунії (*Petunia asteroid mosaic virus*)

RRSV - вірус кільцевої плямистості малини (*Raspberry ringspot virus*)

TRSV - вірус кільцевої плямистості тютюну (*Tobacco ringspot virus*)

TBRV - вірус чорної кільцевої плямистості томатів (*Tomato black ring virus*)

ІФА (ELISA) - імуноферментний аналіз (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

DAS-ELISA - метод подвійного сендвічу ELISA (*Double Antibody Sandwich ELISA*)

OD - оптична густина (*Optical Density*)

PBS - фосфатно-сольовий буферний розчин

PBST - фосфатно-сольовий буферний розчин із додаванням детергенту Tween 20

ВСТУП

Рід *Paeonia L.* посідає чільне місце у світовому асортименті квітково-декоративних культур завдяки своїй довговічності та високим естетичним характеристикам. Однак інтенсивна інтродукція нових сортів та вегетативне розмноження створюють сприятливі умови для накопичення та поширення вірусних фітопатогенів.

На сьогодні вірусні хвороби є однією з головних загроз для колекційних насаджень півоній. Їхня небезпека полягає не лише у пригніченні фізіологічних процесів рослини, але й у безпосередній втраті товарного вигляду: появі плям, деформацій квітки та зменшенні її розмірів. Для Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України, де зібрана унікальна колекція півоній (565 сортів, статус національного надбання), своєчасна діагностика вірусів є критично важливою для збереження генетичного фонду. Оскільки візуальні симптоми часто є неспецифічними, поєднання моніторингу з імуноферментним аналізом є найбільш ефективним підходом до вирішення цієї проблеми.

Актуальність роботи підсилюється нещодавнім відкриттям: у 2023 році вперше у світі було повідомлено про виявлення вірусу згортання листя виноградної лози 3 серотипу (GLRaV-3) у півоніях саме в Україні, у Київському регіоні (Mishchenko et al., 2023). Це свідчить про можливість існування невідомих раніше вірусних патогенів у колекційних насадженнях і необхідність систематичного скринінгу.

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є ідентифікація вірусних збудників на рослинах півоній з вираженими симптомами ураження за допомогою методу імуноферментного аналізу (DAS-ELISA) та опис характеру втрати декоративності.

Завдання дослідження:

– здійснити аналіз наукової літератури щодо поширення, симптоматики та шкідливості вірусів півонії;

– провести візуальне обстеження колекційних насаджень півоній НБС ім. Гришка та відібрати зразки з ознаками вірусного ураження;

– здійснити діагностику відібраних зразків методом DAS-ELISA на панелі з 11 вірусів;

– проаналізувати та інтерпретувати отримані результати.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено серологічний скринінг 9 сортів півоній з колекції НБС ім. М.М. Гришка на панелі з 11 вірусів методом DAS-ELISA. Для чотирьох сортів (Полонез, Медярочка, Gismonda, Casablanca) тестування на наявність вірусів проведено вперше. Отримано нові дані про фітосанітарний стан колекційних насаджень. Паралельно підтверджено широке поширення CLRV серед бузини (Sambucus nigra) у різних регіонах України.

Практичне значення одержаних результатів. Негативні результати DAS-ELISA на 11 вірусів у поєднанні з вираженими візуальними симптомами ураження обґрунтовують необхідність застосування молекулярних методів діагностики (RT-PCR, NGS) для подальшої ідентифікації збудників. Результати можуть бути використані для розробки стратегії фітосанітарного контролю колекційних насаджень півоній НБС.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Ботаніко-біологічна характеристика роду *Paeonia L.*

1.1.1. Систематичне положення та загальна характеристика роду

Рід *Paeonia L.* є єдиним представником родини Paeoniaceae і належить до порядку *Saxifragales*. Тривалий час півонії відносили до порядку Ranunculales через морфологічну подібність із жовтецевими - зокрема, наявність численних тичинок, вільних пелюсток та багатолисточкових плодів. Однак дослідження молекулярної філогенетики кінця XX - початку XXI століття, засновані на аналізі послідовностей ITS (nrDNA), ядерного гену Adh, хлоропластних генів matK та міжгенного спейсера trnH, однозначно показали, що рід *Paeonia* є відокремленою еволюційною лінією в межах порядку *Saxifragales*, і його подібність до *Ranunculales* є конвергентною [1]. Це підтверджено також аналізом морфології пилкових зерен та анатомії провідної системи, що суттєво відрізняються від типових для жовтецевих.

Рід природно поширений у помірних та холодних зонах Північної півкулі: від Південної Європи та Північно-Західної Африки через Євразію до Китаю, Японії та західної частини Північної Америки [1, 2]. Щодо кількості видів у роді серед дослідників немає повної згоди: різні автори виділяють від 25 до 40 видів. Основною причиною розбіжностей є те, що морфологічні ознаки у роді Paeonia не є дискретними, а мають безперервний характер, а також значна внутрішньовидова генетична мінливість [1]. Проте сучасний консенсус, заснований на фундаментальній монографії Hong De-Yuan «Peonies of the World» (2010), визнає близько 33 видів [1, 2].

Рід поділяється на три секції:

– секція Moutan - деревоподібні (деревні) півонії, ендемічні для Центрального та Південного Китаю, включаючи Тибет. Це листопадні напівчагарники висотою до 2–3,5 м. Найвідоміший представник - *P. suffruticosa* (муданова півонія, «цар квітів» у китайській культурі);

– секція *Onaepia* - включає лише два північноамериканські види (*P. brownii* та *P. californica*), що є єдиними представниками роду в Новому Світі;

– секція *Paeonia* - трав'янисті євразійські види, до яких належить більшість культивованих сортів, зокрема *P. lactiflora* (молочноквіткова півонія) - основний вид для селекції декоративних сортів, та *P. officinalis* (лікарська півонія) - класичний європейський вид [1].

Окрему групу становлять так звані іто-гібриди (Intersectional hybrids) - міжсекційні гібриди між трав'янистими (секція *Paeonia*) та деревоподібними (секція *Moutan*) півоніями. Перші успішні гібриди були отримані японським селекціонером Тоїчі Іто у 1948 році. Іто-гібриди поєднують кращі риси обох груп: великі квітки різноманітних кольорів (включаючи жовтий), міцні стебла та витривалість трав'янистих форм. Вони відрізняються підвищеною стійкістю до хвороб, що робить їх цінними об'єктами для колекцій та ландшафтного озеленення [2, 3].

1.1.2. Морфологічні та біологічні особливості

Підземна частина. Коренева система роду *Paeonia* складається з двох типів коренів: потовщених м'ясистих (запасаючих) та тонких живильних (всмоктувальних) [2]. М'ясисті корені розташовані радіально від короткого підземного стебла - кореневища (ризоми) і виконують функцію запасаючих органів, акумулюючи поживні речовини (крохмаль, цукри) для забезпечення інтенсивного росту у наступному вегетаційному сезоні. Тонкі корені забезпечують поглинання води та мінеральних речовин. М'ясисті корені утворюються шляхом метаморфозу тонких або стрижневих коренів сіянців і включають процеси морфогенезу та накопичення поживних речовин [16].

На кореневищі формуються бруньки відновлення двох типів: великі (генеративні) та дрібні (вегетативні, сплячі). Великі бруньки розвиваються у пагони наступного року, тоді як дрібні залишаються в стані спокою і є резервом для відновлення рослини [3, 16].

Надземна частина. Стебла (пагони) трав'янистих півоній виростають безпосередньо з кореневища і досягають висоти від 25 см у карликових форм до 100–120 см у високорослих сортів. У деревоподібних видів висота надземної частини може становити 2–3,5 м. У верхній частині стебла можуть розгалужуватися, утворюючи короткі бічні пагони [2, 3].

Листковий апарат вирізняється високою декоративністю і зберігає привабливий вигляд протягом усього вегетаційного сезону. Листки позбавлені прилистників та залозок. Молодий листок має ніжну текстуру, інколи з червонуватим відтінком; після формування плодів вона грубішає і стає шкірястою. Черешки біля основи зазвичай сплощені [2, 3].

Генеративні органи. Квітки великі, переважно поодинокі, розташовані на верхівках пагонів, хоча у деяких видів *(P. lactiflora, P. emodi, P. veitchii*) можуть утворюватися додаткові квітки у пазухах верхніх листків. Квітки бісексуальні, актиноморфні (радіально-симетричні), з подвійною оцвітиною. Чашечка складається з 3–7 вільних чашолистків різного розміру та форми, які зберігаються при плодах. Віночок включає переважно 5–8 (інколи до 13) вільних пелюсток оберненояйцеподібної або округлої форми [2]. Андроцей складається з численних (до 200 і більше) вільних тичинок, що утворюють характерний нектарний диск навколо основи маточок. Гінецей складається з 1–8 вільних плодолистків, кожен з яких розвивається у листянку. Квітки закриваються вночі або при похмурій погоді; запилення здійснюється комахами [2, 3].

За будовою квітки культурні сорти поділяються на кілька садових груп: прості (одно- або дворядні пелюстки), напівмахрові, японські (з видозміненими тичинками - стамінодіями), анемоноподібні та махрові (з повністю подвійними квітками). Ця класифікація має важливе значення для сортоопису та каталогізації [2, 3].

Плоди та насіння. Плід - багатолистянка з 1–8 (частіше 2–5) листянок, що при дозріванні розкриваються по черевному шву. Насіння кулясте, великі

(5–10 мм у діаметрі), спочатку червоне або чорне, блискуче. Насіння має подвійний спокій (морфологічний та фізіологічний), для подолання якого потрібна стратифікація за схемою «тепло–холод–тепло», що може тривати до двох років. Через це насіннєве розмноження використовується переважно у селекційній роботі, а сіянці зацвітають лише на 4–7 рік [3, 16].

Розмноження та життєвий цикл. Трав'янисті півонії розмножуються переважно вегетативно - поділом кореневища. Цю процедуру оптимально проводити восени (серпень–вересень). Рослину викопують, очищають від землі для кращої видимості бруньок відновлення і ділять на фрагменти так, щоб кожна ділянка мала повноцінну частину кореневої системи та від 3 до 5 здорових бруньок. Глибина посадки є критично важливою: бруньки повинні знаходитись на глибині 2,5–5 см від поверхні землі. Заглиблена посадка гальмує розвиток і призводить до відсутності цвітіння. Ділянки з кількома бруньками зазвичай зацвітають на другий рік, тоді як ділянки з однією-двома бруньками потребують кількох років для досягнення зрілості [3, 16].

Деревоподібні форми найчастіше розмножують щепленням на корінь трав'янистих видів, при цьому місце щеплення заглиблюють у ґрунт для стимуляції власного коренеутворення. Також можливе розмноження живцюванням та відводками [3].

Вегетативний цикл трав'янистих півоній включає весняне відростання пагонів з бруньок кореневища, інтенсивний ріст, бутонізацію, цвітіння (травень–червень, тривалість 7–14 діб для окремого сорту), формування плодів та поступове відмирання надземної частини восени після перших заморозків. Протягом літньо-осіннього періоду в підземних бруньках вже закладаються зачатки квіток наступного року. Для нормального розвитку рослини потребують період зимового спокою з достатнім накопиченням холоду (vernalization). У регіонах із теплими зимами, де рослини не отримують достатньої кількості холодних годин, спостерігається поступове зниження інтенсивності цвітіння [3, 16].

Максимального розвитку та декоративності куст досягає на 5–7 рік вегетації. Півонії є надзвичайно довговічними рослинами: окремі кущі можуть успішно рости та цвісти понад 50–100 років на одному місці без пересадки [2,3].

Важливо з точки зору фітопатології, що вегетативне розмноження - головний спосіб отримання сортового матеріалу - неминуче передає всі системні вірусні інфекції від материнської рослини до дочірніх. Це означає, що одного разу інфікований маточний кущ стає джерелом зараження для всіх отриманих від нього ділянок, що є основним механізмом поширення вірусних хвороб у культурі півоній [4, 7].

1.1.3. Екологічні вимоги до культивування

Півонії є вираженими геліофітами - для повноцінного розвитку та рясного цвітіння їм необхідно щонайменше 8 годин прямого сонячного освітлення на добу. У затінених місцях рослини зберігають листя, але цвітуть слабо або не цвітуть зовсім. Місця посадки повинні бути захищені від постійних протягів та сильних вітрів [3].

Культура адаптована до більшості типів ґрунтів, проте найкращі результати демонструє на родючих, глибоких суглинкових або глинистих ґрунтах з хорошим дренажем і нейтральною або слабколужною реакцією (pH 6,5–7,5). Надмірно вологі та заболочені ділянки категорично непридатні для вирощування півоній, оскільки перезволоження сприяє розвитку кореневих гнилей [3].

Зимостійкість трав'янистих півоній висока: більшість сортів витримують температури до –30..–40 °C (зони USDA 3–8). Підготовка до зимового періоду включає зрізання надземної маси до рівня землі після перших заморозків. Місця осінньої посадки рекомендується мульчувати шаром торфу товщиною 5–7 см, який навесні обов'язково знімають [3].

1.1.4. Культурне та економічне значення

Історія культивування півоній налічує понад 3 900 років. У Китаї Paeonia lactiflora вирощується з давніх часів як лікарська та декоративна рослина, а P. suffruticosa (муданова півонія) отримала статус «царя квітів» і є символом процвітання та благородства. Корені *P. lactiflora* (*Bai Shao* - «біла півонія» і *Chi Shao* - «червона півонія») є одними з найважливіших компонентів традиційної китайської медицини і використовуються понад 1 500 років для лікування запальних процесів, гінекологічних захворювань, гіпертонії та больових синдромів [4, 11].

Починаючи з XII століття, півонії активно вирощують у Європі. У Японії з XVI століття селекція набула особливого розмаху, де було виведено окрему групу - «японські» сорти, які відрізняються характерними стамінодіями замість тичинок. У XIX столітті центр селекційної роботи перемістився у Францію (сорти Лемуана, Крусс, Дессера) та Велику Британію, а після Першої світової війни - до США, де були створені багато видатних сортів, що й донині залишаються еталонами [3, 4].

Сучасний світовий сортимент налічує понад 10 000 сортів трав'янистих та деревоподібних півоній. Понад 25 країн виробляють зрізані півонії як промислову культуру, при цьому основні ринки розташовані в Європі, Азії та США [4]. Американське товариство півоній (American Peony Society), засноване у 1903 році, є Міжнародним органом реєстрації сортів (ICRA) і визнає понад 7 000 зареєстрованих культиварів [2].

Окрім декоративного значення, рід *Paeonia* має суттєву фармакологічну цінність.Фармакологічні дослідження підтвердили протизапальні, протипухлинні, противірусні, серцево-судинні, нейропротекторні та імуномодулюючі властивості екстрактів півоній [4, 11]. В Україні офіційно зареєстрована настоянка з півоній, яка використовується як седативний препарат у науковій медицині.

Насіння деяких видів півоній містять ненасичені жирні кислоти (олеїнова, лінолева, пальмітинова) і використовуються для виробництва

поживної олії. У золі листя та кореневищ виявлено 19 мікро- та макроелементів, зокрема залізо, фосфор, кальцій, цинк та калій [11].

Зростання попиту на півонії у світовому масштабі стимулює розвиток селекції, спрямованої на створення не лише декоративних, а й лікарських та харчових сортів. Незважаючи на розвиток молекулярних методів та мікроклонального розмноження in vitro, традиційний вегетативний поділ кореневищ залишається основним промисловим способом розмноження сортового матеріалу [3, 16].

1.2. Колекція півоній НБС імені М.М. Гришка НАН України

Національний ботанічний сад імені М.М. Гришка НАН України (НБС) є провідною науковою установою України в галузі інтродукції та акліматизації рослин. Сад розташований у Києві на площі 129,86 га і містить унікальні колекції, що нараховують понад 16 тисяч видів, форм та сортів рослин із різних ботаніко-географічних регіонів світу [12].

Колекція півоній НБС є найбільшою в Україні та однією з найбагатших у Східній Європі. Вона представлена 9 видами та 565 сортами. У 2006 році, згідно з розпорядженням Кабінету Міністрів України, колекцію півоній було віднесено до реєстру наукових об’єктів, що становлять національне надбання [12].

Системна селекційна робота з півоніями в Україні розпочалась у 1950 році і нерозривно пов’язана з ім’ям М.М. Гришка. Нині справу розширення асортименту продовжує селекціонер В.Ф. Горобець, який є автором 27 нових сортів, адаптованих до вітчизняних кліматичних умов [12]. Колекція служить базою для проведення різнопланових наукових досліджень та еталоном, на фоні якого проходить державне сортовипробування півонії.

Проте інтенсивна інтродукція нових сортів та переважно вегетативне розмноження створюють сприятливі умови для накопичення та поширення вірусних фітопатогенів, що становить серйозну загрозу для збереження

колекційного генофонду. Саме тому своєчасна діагностика вірусних захворювань є критично важливим завданням для колекційних насаджень НБС [7].

1.3. Вірусні захворювання півоній

1.3.1. Загальна характеристика вірусних хвороб півоній

Вірусні захворювання півоній історично відомі під назвами «кільцева плямистість півоній» (peony ringspot) або «мозаїка півоній» (peony mosaic). Основні симптоми включають зміну кольору та форми листя, порушення цвітіння, а у тяжких випадках - карликовість рослин і повну відсутність квіткування [4, 5]. Небезпека вірусних інфекцій полягає не лише у пригніченні фізіологічних процесів, але й у безпосередній втраті декоративної та товарної цінності рослин: появі плям, деформацій квіток, зменшенні їх розмірів.

Більшість відомих вірусів півоній мають одноланцюгові РНК-геноми позитивного сенсу і належать до родин *Virgaviridae*, *Secoviridae*, *Bromoviridae, Betaflexiviridae ma Closteroviridae* [4]. На сьогоднішній день ДНК-віруси, що вражають півонії, не зафіксовані. Візуальні симптоми часто є неспецифічними та можуть імітувати прояви дефіциту поживних речовин або абіотичного стресу, що ускладнює діагностику [4, 9].

1.3.2. Основні вірусні збудники

Вірус брязкальця тютюну (TRV, Tobacco rattle virus) - один з найбільш вивчених та поширених вірусів півоній. Належить до роду *Tobravirus*, родини *Virgaviridae*. Має паличкоподібні віріони та дволанцюговий РНК-геном позитивного сенсу. Переноситься нематодами родів *Trichodorus* та *Paratrichodorus*. Симптоми включають кільцеву плямистість листків, концентричні смуги темного та світлого кольору, інколи з некротичними ділянками та жовтою мозаїкою. TRV зареєстрований у півоніях у Новій Зеландії, Японії, Алясці, Огайо та штаті Вашингтон (США) [4, 5, 6].

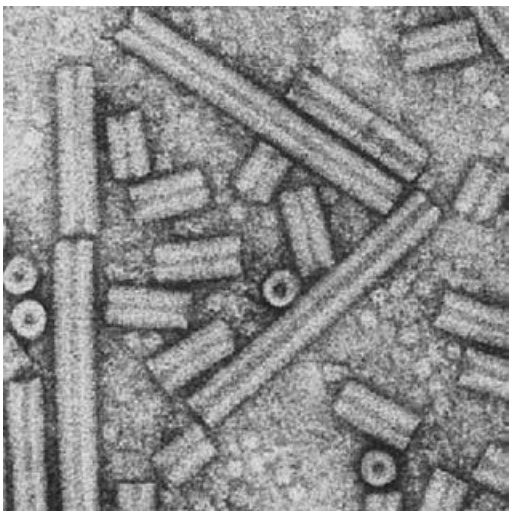


Рис.1.1.Вірус брязкальця тютюну (*TRV, Tobacco rattle virus*)

Вірус плямистого в'янення томатів (TSWV, Tomato spotted wilt virus) - належить до родини *Tospoviridae*, має РНК-геном негативного сенсу та надзвичайно широкий спектр хазяїнів (понад 1000 видів рослин). Переноситься трипсами. На півоніях спричинює лінійні візерунки та жовто-зелені мозаїки, а також хлороз, затримку росту, дрібніше та деформоване листя і квіти [4, 13].



Рис.1.2. Вірус плямистого в'янення томатів (TSWV, Tomato spotted wilt virus)

Вірус мозаїки люцерни (AMV, Alfalfa mosaic virus) - РНК-вірус із позитивним сенсом, родина *Bromoviridae*. Ідентифікований як збудник мозаїчних та лінійчастих візерунків на півоніях в Італії та США. Вірус огіркової мозаїки (CMV) зареєстрований на півоніях у Франції [4].

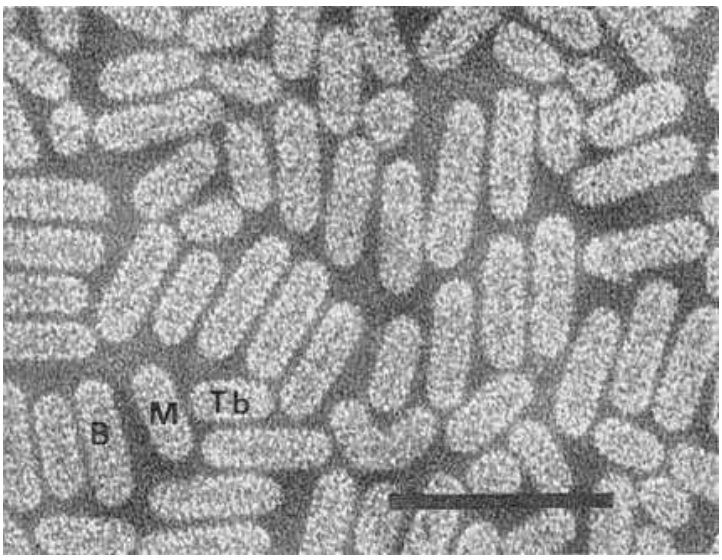


Рис.1.3. Вірус мозаїки люцерни (AMV, Alfalfa mosaic virus)

Вірус некротичної затримки росту цикасів (CNSV, Cycas necrotic stunt virus) - неповірус із родини Secoviridae. Виявлений у *P. lactiflora, P. suffruticosa* та гібридів *P. officinalis* × *P. lactiflora*. Спричинює хлороз, затримку росту, кучерявість листя та некроз. Описана коінфекція TRV та CNSV у P. lactiflora, при якій рослини з подвійною інфекцією мають більш виражені симптоми, ніж рослини, інфіковані лише одним вірусом [5].

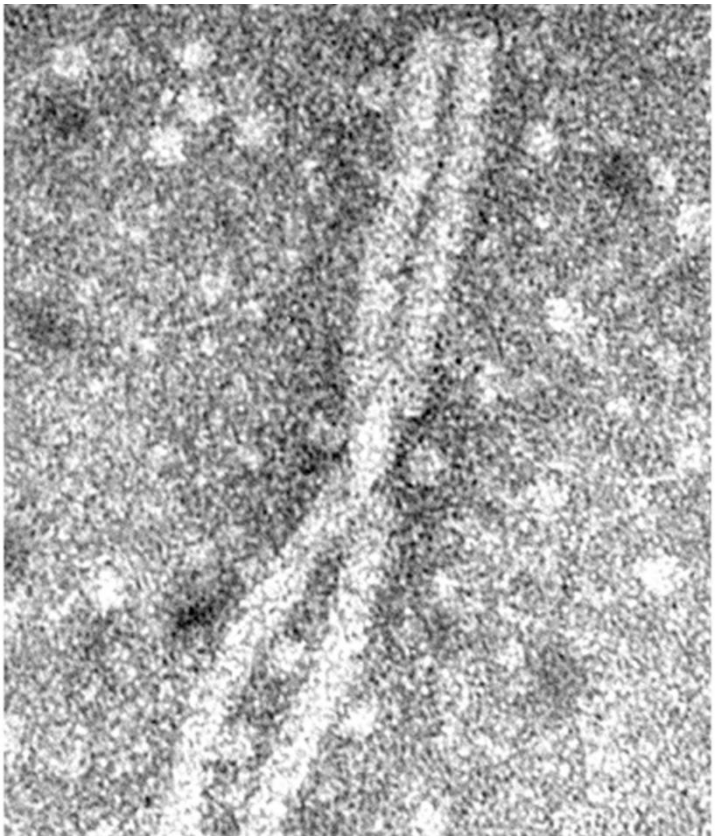


Рис.1.4. Вірус некротичної затримки росту цикасів (CNSV, Cycas necrotic stunt virus)

Віруси, асоційовані зі згортанням листя виноградної лози (GLRaV).

Ця група вірусів родини *Closteroviridae* традиційно вважалася патогенами виключно виноградної лози. Однак нещодавні дослідження суттєво розширили уявлення про коло їхніх хазяїнів. У 2023 році Mishchenko та співавтори вперше повідомили про виявлення GLRaV-3 у півоніях в Україні, що стало першим у світі повідомленням про природне інфікування півоній цим вірусом [7]. Шість сортів півоній із Київського регіону мали виражене згортання та деформацію листя, карликовість і мозаїку. Тестування методом DAS-ELISA на 12 поширених вірусів дало негативний результат, і лише подальше дослідження за допомогою електронної мікроскопії та ПЛР у реальному часі виявило GLRaV-3 [7].

Також описано виявлення вірусів GLRaV-1, GLRaV-7 та нового вірусу, асоційованого зі згортанням листя півоній (PLRaV), у півоніях у Китаї. Філогенетичний аналіз показав, що PLRaV кластеризується з GLRaV-1 та GLRaV-13 у роді *Ampelovirus* [4]. Ці знахідки ставлять питання про те, які ще рослинні види, окрім винограду, можуть бути природними хазяїнами GLRaV і виступати резервуаром для вірусу.

Серед інших вірусів, зареєстрованих на півоніях, слід зазначити: вірус плямистості листя цитрусових (CLBV), вірус бóрозенчастості стебла яблуні (ASGV), вірус кільцевої плямистості малини (RRSV), вірус латентної кільцевої плямистості суниці (SLRSV), вірус лінійного візерунка виноградної лози (GLPV) та вірус, асоційований з пожовтінням півоній (PYaCV) [4].

1.3.3. Вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV)

Вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV, Cherry leaf roll virus) належить до роду *Nepovirus*, родини *Secoviridae*. Вперше описаний у 1933 році на *Juglans regia* та *Prunus avium*, CLRV має широке коло хазяїнів серед деревних та чагарникових рослин. В Україні CLRV вперше виявлено на бузині

чорній (*Sambucus nigra*) у 2021 році [15], а у 2024 році - на волоському горісі (Juglans regia) у Полтавській області [14]. Обидва повідомлення належать дослідницькій групі Л.Т. Міщенко та А.А. Дуніч з Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

CLRV передається насінням та пилком, що робить його особливо небезпечним для колекційних насаджень. Ізоляти вірусу демонструють виражену хазяїн-специфічну популяційну структуру: більшість ізолятів горіха кластеризуються у філогенетичну групу D1, тоді як ізоляти бузини належать до окремих груп. Для діагностики CLRV широко застосовується DAS-ELISA зі специфічними антитілами (зокрема, комерційні антитіла Loewe, Німеччина) [14, 15].

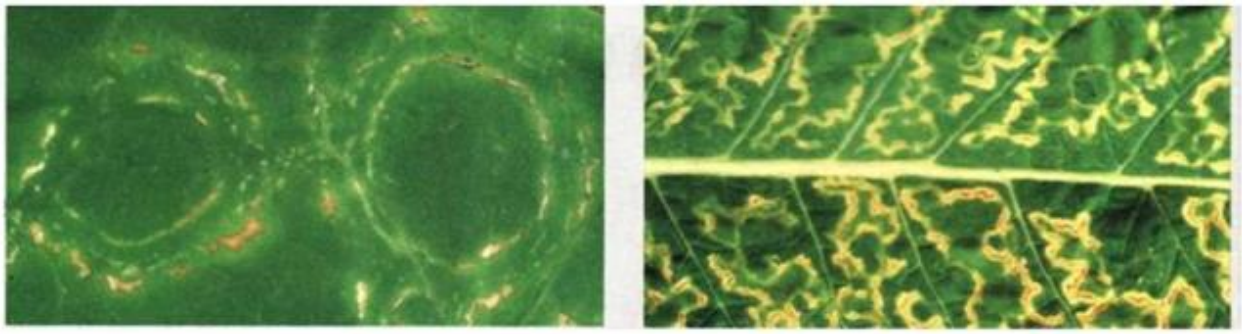


Рис.1.5. Вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV**)**

1.3.4. Шляхи передачі та поширення вірусів

Вірусні патогени півоній передаються різними шляхами: через ґрунтових нематод-переносників (TRV), комах-векторів, зокрема трипсів (TSWV) та попелиць (CMV), а також через заражений рослинний матеріал при вегетативному розмноженні. Останній механізм є особливо критичним для півоній, оскільки поділ кореневищ - основний спосіб розмноження сортових рослин - неминуче призводить до передачі системних вірусних інфекцій від материнської рослини до всіх дочірніх [4, 13].

Для GLRaV-3 основним вектором у виноградарстві є борошнисті черв’яки (*Pseudococcidae*) та м’які щитівки (*Coccidae*), однак механізм передачі цього вірусу між рослинами півонії ще не з’ясований. Не

виключається можливість міжвидової передачі через ґрунт або спільні вектори в умовах ботанічних садів, де різні види рослин зростають у безпосередній близькості [7, 10].

1.4. Методи діагностики вірусів рослин

1.4.1. Візуальна діагностика

Візуальний огляд є первинним та найдоступнішим методом діагностики вірусних захворювань. Характерні симптоми, такі як кільцева плямистість, хлороз, мозаїка, некроз, деформація листя та затримка росту, слугують важливими індикаторами вірусної інфекції [4, 9]. Однак цей метод має суттєві обмеження: деякі інфекції перебігають безсимптомно або з латентною фазою, а специфічні вірусні симптоми часто перекриваються з проявами дефіциту мінеральних елементів чи абіотичного стресу, що може призводити до хибної діагностики [4].

Для півоній додатковим ускладненням є те, що симптоми різних вірусних захворювань (кільцевої плямистості та плямистого в'янення) можуть бути настільки подібними, що їх легко сплутати між собою [13]. Тому візуальна діагностика повинна обов'язково доповнюватися лабораторними методами підтвердження.

1.4.2. Серологічні методи. DAS-ELISA

Серологічні методи базуються на специфічному розпізнаванні вірусних антигенів антитілами і є одними з найширше застосовуваних у фітовірусології завдяки своїй швидкості, специфічності та простоті виконання [8, 9]. Імуноферментний аналіз (ІФА, або ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) залишається найпопулярнішим методом рутинного аналізу, що пояснюється історичними причинами, простотою проведення та комерційною доступністю специфічних антитіл для основних вірусів рослин [9].

Модифікація DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA, метод «подвійного сендвічу») є стандартною процедурою для виявлення вірусних

антигенів у рослинних тканинах [8]. Принцип методу полягає в послідовному формуванні комплексу «антитіло–антиген–антитіло-кон'югат» на поверхні лунок мікропланшета. Метод включає кілька основних етапів:

1) сенсибілізація планшета: лунки покриваються первинними антитілами (АТ1), розведеними в карбонатному буфері (CCB, pH 9,5–9,7) у співвідношенні 1:200, з подальшою інкубацією при 37°C протягом 4 годин;

2) внесення зразків: рослинний матеріал гомогенізують у буфері зразка (GEB), центрифугують, і надосадову рідину вносять у лунки з нічною інкубацією при 4°C;

3) додавання кон'югату: вторинні антитіла, мічені ферментом (АТ2), вносять у лунки з інкубацією при 37°C протягом 4 годин;

4) субстратна реакція: додається субстрат для ферменту (зазвичай п-нітрофенілфосфат), і після інкубації проводиться зчитування оптичної густини (OD) на довжині хвилі 405 нм за допомогою спектрофотометра [8].

Позитивним вважається результат, при якому OD зразка у 2–3 рази перевищує значення негативного контролю. Між кожним етапом проводиться відмивка лунок буфером PBST для видалення незв'язаних компонентів [8].

Серед переваг DAS-ELISA - висока пропускна здатність (можливість одночасного тестування десятків зразків), відносна дешевизна та доступність комерційних антитіл для широкого спектру фітовірусів. Разом з тим, метод має й певні обмеження: він не може виявити вірус, для якого немає антитіл у тест-системі, має меншу чутливість порівняно з молекулярними методами (ПЛР), а також може давати хибнонегативні результати при низькій концентрації вірусу в тканинах або при наявності невідомих серологічних варіантів [9, 10].

1.4.3. Молекулярні методи діагностики

Молекулярні методи, зокрема зворотна транскрипція з полімеразною ланцюговою реакцією (RT-PCR) та кількісна ПЛР у реальному часі (qPCR), забезпечують вищу чутливість та специфічність порівняно із серологічними

тестами. Вони здатні виявляти мінімальні кількості вірусних нуклеїнових кислот у рослинних тканинах [4, 9]. Саме за допомогою RT-PCR вдалося підтвердити наявність GLRaV-3 у півоніях в Україні після того, як стандартна DAS-ELISA на 12 поширених вірусів дала негативний результат [7].

Секвенування наступного покоління (NGS) є перспективним інструментом для вивчення метагеноміки вірусних інфекцій рослин. Ця технологія дозволяє проводити широкоспектральну ідентифікацію вірусів, мультиплексне виявлення, кількісну оцінку та відкриття нових вірусних збудників. Очікується, що з подальшим зниженням вартості NGS стане стандартом у діагностиці вірусних захворювань рослин [9, 10].

Оптимальною стратегією діагностики є поєднання різних підходів: первинний скринінг методом DAS-ELISA з подальшим підтвердженням позитивних або сумнівних результатів молекулярними методами [4, 7, 9].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об’єкти дослідження

2.1.1. Досліджувані сорти півоній

Об’єктами дослідження виступали 9 сортів півоній (*Paeonia spp.*) з колекції Національного ботанічного саду імені М.М. Гришка НАН України. Сорти були відібрані на підставі попереднього візуального обстеження колекційних насаджень, проведеного у травні–червні 2025 року. Критерієм відбору слугувала наявність зовнішніх ознак, характерних для вірусного ураження: кільцева плямистість листя, деформація листкових пластин, зміна форми та розмірів листя, карликовість рослин [16, 19].

Перелік досліджуваних сортів наведено у Таблиці 2.1. Серед них шість сортів зарубіжної селекції (Mr. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei), один сорт (*Casablanca*) та два сорти української селекції (Полонез і Медярочка, автор - В.Ф. Горобець). Сорти Полонез, Медярочка, Gismonda та Casablanca досліджувалися на наявність вірусів методом DAS-ELISA вперше. Рослинний матеріал (листя) для аналізу було зібрано 10 червня 2025 року безпосередньо з рослин на ділянці «Пори року» НБС ім. Гришка. Під час збору фіксувалися візуальні симптоми ураження для кожного зразка.

Таблиця 2.1 Досліджувані сорти півоній та їхні візуальні симптоми

№ зразка	Культура	Сорт	Колекц. №	Візуальні симптоми
N14	Півонія	*Mr. G.F. Hemerik*	№ 1	Кільцева плямистість
N22	Півонія	*Judy Anne*	№ 2	Симптоми ураження
N19	Півонія	*Edwin C. Bills*	№ 3	Нерозвинена деформація
N20	Півонія	*Mrs. Wilder Bancroft*	№ 5	Кільцева плямистість
N17	Півонія	*Gismonda*	№ 9	Нерозвинена деформація
N21	Півонія	*Lorelei*	№ 12	Симптоми ураження
N15	Півонія	*Casablanca*	№ 23	Деформація листя
N16	Півонія	Полонез	№ 26	Листя іншої форми
N18	Півонія	Медярочка	№ 30	Деформація листя

Сорти охоплюють різні садові групи: японські (*Mr. G.F. Hemerik, Mrs. Wilder Bancroft*), махрові (*Judy Anne, Edwin C. Bills, Casablanca, Gismonda*), міжвидові гібриди (*Lorelei*). Така різноманітність дозволяє оцінити поширення вірусних інфекцій у різних групах сортів.



Рис. 2.1. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт M*r. G.F. Hemerik*, колекц. № 1). Візуальні симптоми: кільцева плямистість



Рис. 2.2. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Judy Anne*, колекц. № 2). Візуальні симптоми: симптоми ураження



Рис. 2.3. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Edwin C. Bills*, колекц. № 3). Візуальні симптоми: нерозвинена деформація



Рис. 2.4. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Mrs. Wilder Bancroft*, колекц. № 5). Візуальні симптоми: кільцева плямистість

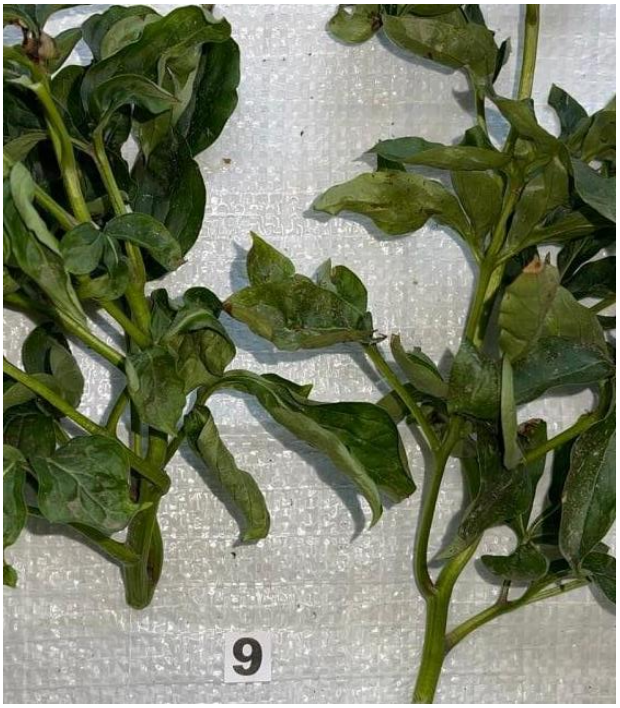


Рис. 2.5. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Gismonda*, колекц. № 9). Візуальні симптоми: нерозвинена деформація



Рис. 2.6. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Lorelei*, колекц. № 12). Візуальні симптоми: симптоми ураження



Рис. 2.7. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт *Casablanca*, колекц. № 23). Візуальні симптоми: деформація листя

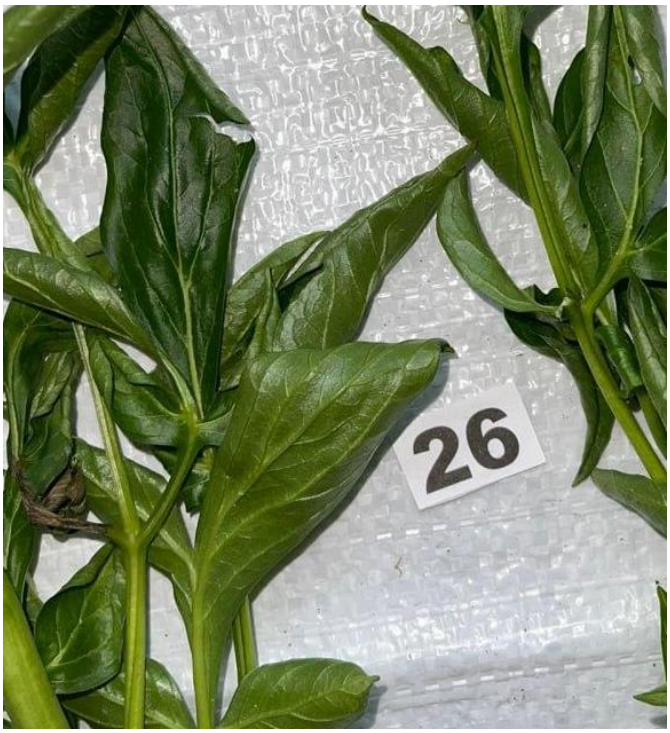


Рис. 2.8. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт Полонез, колекц. № 26). Візуальні симптоми: листя іншої форми



Рис. 2.9. Рослинний матеріал півоній, відібраний для аналізу (сорт Медярочка, колекц. № 30). Візуальні симптоми: деформація листя

2.1.2. Додаткові зразки для аналізу

Окрім півоній, у дослідження було включено 13 зразків бузини (*Sambucus nigra L.*) різного географічного походження (Київ, Київська обл., Конотоп та ін.), зібраних у період з 2 по 19 червня 2025 року (Табл. 2.2). Для частини зразків бузини окремо аналізувалися листки та квітки (зразки N10–N13). Зразки бузини використовувалися для тестування на CLRV, оскільки *S. nigra* є відомим природним хазяїном цього вірусу [15]. Також серед зразків були бузина-позитивний та бузина-негативний контролі для CLRV, що були попередньо перевірені [15].

Таблиця 2.2 Зразки бузини (Sambucus nigra L.)

№ зразка	Рослина	Походження	Дата збору
N1	Бузина, № 4	Київ	09.06.2025
N2	Бузина, № 2	Київ	09.06.2025
N3	Бузина, № 3	Київ	09.06.2025
N4	Бузина, дерево 1	Київська обл., Хмельницький пр.	08.06.2025
N5	Бузина, дерево 2	Київська обл., Хмельницький пр.	08.06.2025
N6	Бузина	Парк	04.06.2025
N7	Бузина	Інне	19.06.2025
N8	Бузина, № 40	Конотоп	02.06.2025
N9	Бузина, Л.Т.	Пос. від.	17.06.2025
N10	Бузина, № 13 (листки)	Київ	08.06.2025
N11	Бузина, № 13 (квітки)	Київ	08.06.2025
N12	Бузина, № 12 (листки)	Київ	08.06.2025
N13	Бузина, № 12 (квітки)	Київ	08.06.2025

Загальна кількість досліджуваних зразків, включаючи півонії, бузину та додаткові контролі, становила 29 одиниць.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Візуальне обстеження

Первинне обстеження колекційних насаджень півоній проводилося візуально у період активної вегетації (травень–червень 2025 р.) на ділянці «Пори року» НБС ім. Гришка. Під час обстеження фіксувалися наступні симптоми вірусного ураження: наявність кільцевих плям та хлоротичних

візерунків на листках, деформація листкових пластин, зміна форми листя порівняно з типовою для сорту, ознаки карликовості або затримки росту, порушення цвітіння [16, 18].

Відібрані рослини з підозрою на вірусне ураження маркувалися за колекційними номерами. Список сортів для лабораторного аналізу було узгоджено з науковими співробітниками НБС (Т.О. Щербакова) та вірусологічної лабораторії (Л.Т. Міщенко, А.А. Дуніч) [14].

2.2.2. Імуноферментний аналіз (DAS-ELISA)

Для виявлення вірусних антигенів у зразках рослинного матеріалу було проведено DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) - метод подвійного сендвічу [8]. Аналіз проводився 19–20 червня 2025 року.

Зразки тестувалися на наявність 11 вірусів, розподілених по 5 мікропланшетах (Табл. 2.3). Вибір панелі вірусів обумовлювався літературними даними про поширення вірусних патогенів на півоніях та бузині, а також наявністю комерційних тест-систем [16, 17].

Таблиця 2.3 Панель вірусів для DAS-ELISA

Планшет	Вірус	Скорочення	Родина
1	Cherry leaf roll virus	CLRV	Secoviridae
2	Tobacco rattle virus	TRV	Virgaviridae
2	Petunia asteroid mosaic virus	PeAMV	Tombusviridae
2	Raspberry ringspot virus	RRSV	Secoviridae
3	Grapevine leafroll-associated virus 1	GLRaV-1	Closteroviridae
3	Grapevine leafroll-associated virus 3	GLRaV-3	Closteroviridae
3	Tobacco necrosis virus	TNV	Tombusviridae
4	Grapevine leafroll-associated virus 7	GLRaV-7	Closteroviridae
4	Grapevine fanleaf virus	GFLV	Secoviridae
5	Tobacco ringspot virus	TRSV	Secoviridae
5	Tomato black ring virus	TBRV	Secoviridae

Буферні розчини. Для проведення DAS-ELISA було приготовано 6 буферних розчинів (Табл. 2.4). Значення pH кожного буфера доводили до необхідного рівня шляхом додавання відповідної кислоти або лугу.

Таблиця 2.4 Буферні розчини для DAS-ELISA

Буфер	Склад	pH	Зберігання
PBS (0,1 М натрій-фосфатний)	NaCl, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, KCl	7,3–7,5	Кімн. т-ра
CCB (карбонатний)	Na_2CO_3, $NaHCO_3$	9,5–9,7	2–8 °C
PBST (буфер відмивки)	PBS + Твін-20 (0,5 мл/л)	7,2–7,6	Кімн. т-ра
GEB (буфер зразка)	Na_2SO_3, ПВП, яєчний альбумін, Твін-20	7,2–7,8	2–8 °C
ECI (буфер для розведення)	ПВП, БСА в PBST	7,2–7,6	2–8 °C
PNP (субстратний)	Диетаноламін (97 мл/л)	9,7–9,9	Кімн. т-ра

Підготовка зразків. Листя (або квітки - для окремих зразків бузини) попередньо подрібнювали ножицями, після чого пересипали у фарфорову ступку, заливали рідким азотом та перетирали до однорідного стану. Після випаровування рідкого азоту зразки заливали фосфатним буфером PBS у пропорції 1 мг зразка на 2 мл 0,1 М PBS і продовжували гомогенізацію до утворення однорідної субстанції. Отриманий гомогенат фільтрували через марлеву тканину у мікропробірки та центрифугували при 3500 об./хв протягом 5 хв [8, 15].



Рис. 2.1. Гомогенати дослідних зразків у мікропробірках після центрифугування

Етап 1. Сенсибілізація планшета. Первинні антитіла (АТ1) розводили у карбонатному буфері (ССВ) у співвідношенні 1:200 і вносили по 100 мкл у кожну лунку мікропланшета. Інкубацію проводили в термостаті при 37°С протягом 4 годин. Після інкубації виконували триразову відмивку лунок буфером PBST по 5 хв кожна - для видалення антитіл, що не були адсорбовані на поверхні лунок [8].

Етап 2. Внесення зразків. У лунки вносили по 50 мкл надосадової рідини очищених центрифугуванням зразків та 50 мкл буферу зразка (GEB). Паралельно вносили негативний та позитивний контролі. Негативним контролем для CLRV слугувало листя бузини, в якому попередньо не було виявлено антигену CLRV; позитивним - листя бузини з підтвердженою наявністю CLRV [15]. Інкубацію проводили впродовж ночі при 4°С. Далі виконували триразову відмивку буфером PBST за тією ж схемою.

Етап 3. Внесення кон'югату. Вторинні антитіла (АТ2), мічені ферментом лужної фосфатази, розводили у буфері зразка (ECI) у співвідношенні 1:200 і вносили по 100 мкл у кожну лунку. Інкубацію проводили при 37°С протягом 4 годин. Наступна відмивка включала три акти промивання PBST по 5 хв та додатковий акт промивання 0,1 М PBS протягом 5 хв [18].

Етап 4. Субстратна реакція. Готували субстратний розчин (п-нітрофенілфосфат у буфері PNP) і вносили по 100 мкл у кожну лунку. Заключну інкубацію проводили при 37°C протягом 1,5 години.

2.2.3. Реєстрація та інтерпретація результатів

Результати DAS-ELISA реєстрували за допомогою спектрофотометра Thermo Labsystems Opsis MR (USA) з програмним забезпеченням Dynex Revelation QuickLink (версія 4.24) на довжині хвилі 405 нм. Дані виводилися у форматі OD-матриць (Data Matrix Table: OD) для кожного планшета.

Критерій позитивності: результат вважався позитивним, якщо значення оптичної густини (OD) дослідного зразка щонайменше у 3 рази перевищувало середнє значення OD негативного контролю [8]. Кожний зразок тестувався у двох повторностях.



Рис.2.1 Дата проведення аналізу: 20 червня 2025 року. Оператори: Міщенко Л.Т. (планшет 1 - CLRV), Дуніч А.А. (планшети 2–5).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Результати візуального обстеження

Під час візуального обстеження колекційних насаджень півоній НБС ім. М.М. Гришка у червні 2025 року було виявлено рослини з ознаками, характерними для вірусного ураження. Симптоми варіювали залежно від сорту.

У сортів Mr. G.F. Hemerik та Mrs. Wilder Bancroft спостерігалася **кільцева плямистість листя** - концентричні кільця неправильної форми від світло-жовтого до темно-жовтого кольору на листкових пластинах. Цей симптом є класичним проявом вірусних інфекцій, зокрема TRV та неповірусів [21, 24].

У сортів Edwin C. Bills та Gismonda зафіксовано **нерозвинену деформацію** листкових пластин: листки мали нетипову для сорту форму, були дрібнішими та асиметричними. Подібні ознаки можуть вказувати на системну вірусну інфекцію, що впливає на морфогенез [24, 23].

Сорти Casablanca, Полонез та Медярочка демонстрували **деформацію листя** різного ступеня вираженості: зміну форми листкових пластин, їх скручування та порушення симетрії. Сорт Полонез додатково відрізнявся наявністю листя з нетиповою для сорту морфологією.

Сорти Judy Anne та Lorelei мали загальні **ознаки вірусного ураження** (хлоротичні ділянки, незначні деформації), які не вкладалися у чітко визначену симптоматичну картину одного конкретного захворювання.

Слід зазначити, що візуальна діагностика має обмежену специфічність: аналогічні симптоми можуть спричинюватися абіотичними факторами (дефіцит мікроелементів, водний стрес, механічні пошкодження), грибковими захворюваннями або комбінацією кількох чинників [24, 20]. Тому для підтвердження вірусної етіології було проведено лабораторний аналіз методом DAS-ELISA.

3.2. Результати DAS-ELISA

3.2.1. Результати тестування півоній

У результаті проведення DAS-ELISA на панелі з 11 вірусів жоден з тестованих вірусних антигенів не було виявлено у зразках усіх 9 сортів півоній. Значення оптичної густини (OD) дослідних зразків перебували на рівні негативного контролю або незначно перевищували його, не досягаючи порогу позитивності (3×OD негативного контролю). Зведені результати наведено у Таблиці 3.1.

Таблиця 3.1 Зведені результати DAS-ELISA для зразків півоній

Сорт	CLRV	TRV	PeAMV	RRSV	GLRaV-1	GLRaV-3	TNV	GLRaV-7	GFLV	TRSV	TBRV
Mr. G.F. Hemerik	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Judy Anne	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Edwin C. Bills	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Mrs. Wilder Bancroft	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Gismonda	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Lorelei	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Casablanca	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Полонез	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–
Медярочка	–	–	–	–*	–	–	–	–	–	–	–

Примітки: «–» - вірус не виявлено; «–*» - відсутні контролі для коректної інтерпретації.

Деталізація результатів за кожним планшетом наведена у Таблиці 3.2, де подано діапазон значень OD для зразків півоній у порівнянні зі значеннями негативного контролю.

Таблиця 3.2 Результати DAS-ELISA по планшетах (зразки півоній)

Планшет	Вірус	OD зразків (діапазон)	OD K–	Результат
1	CLRV	≤ 0,005	0,003	–
2	TRV	≤ 0,010	0,005	–
2	PeAMV	≤ 0,008	0,005	–
2	RRSV	≤ 0,006	–**	–**
3	GLRaV-1	≤ 0,009	0,004	–
3	GLRaV-3	≤ 0,007	0,004	–
3	TNV	≤ 0,010	0,005	–
4	GLRaV-7	≤ 0,012	0,006	–
4	GFLV	≤ 0,009	0,006	–
5	TRSV	≤ 0,010	0,005	–
5	TBRV	≤ 0,008	0,005	–

Примітки: ** - для RRSV відсутні належні контрольні зразки, тому результат не може бути достовірно інтерпретований.

Планшет 1 (CLRV). Значення OD зразків півоній (N14–N22) не перевищували 0,005, що було на рівні негативного контролю (0,003). Вірус кільцевої плямистості вишні (CLRV) у півоніях не виявлено.

Планшет 2 (TRV, PeAMV, RRSV). Жоден із трьох вірусів не був виявлений у зразках півоній. Для RRSV (вірус кільцевої плямистості малини) слід зазначити відсутність належних контрольних зразків, що знижує достовірність інтерпретації результату для цього вірусу.

Планшет 3 (GLRaV-1, GLRaV-3, TNV). Значення OD для всіх трьох вірусів перебували на рівні негативного контролю. Віруси, асоційовані зі згортанням листя виноградної лози серотипів 1 та 3, а також вірус некрозу тютюну у зразках півоній не виявлено.

Планшет 4 (GLRaV-7, GFLV). Значення OD для GLRaV-7 у деяких зразках були дещо вищими за негативний контроль (≤ 0,012 порівняно з K– = 0,006), однак не досягали порогу позитивності (≥ 0,018). Результат оцінено як

«приблизно на рівні контролю» (≈ K). Для вірусу віялкового листя виноградної лози (GFLV) - аналогічно.

Планшет 5 (TRSV, TBRV). Вірус кільцевої плямистості тютюну та вірус чорної кільцевої плямистості томатів у зразках півоній не виявлено. Значення OD відповідали негативному контролю.

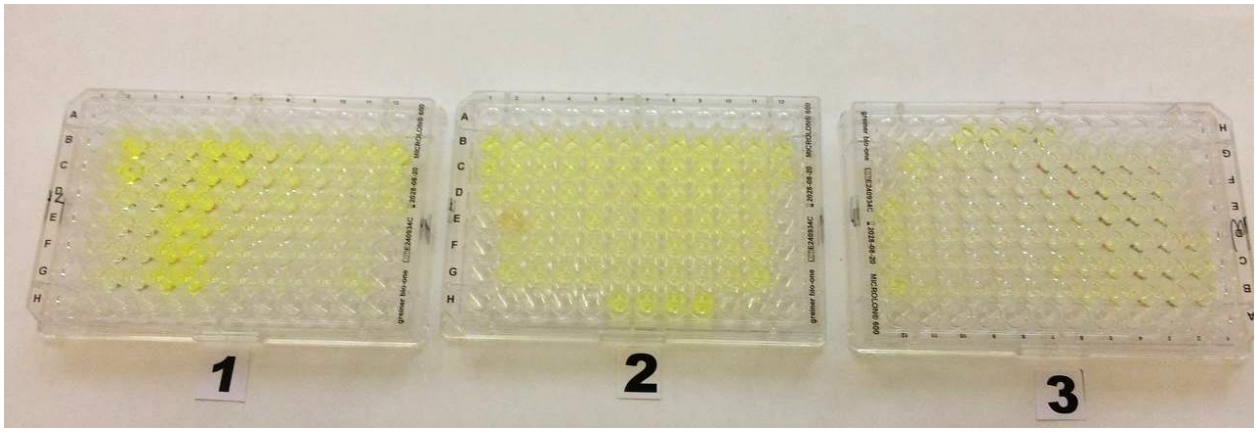


Рис. 3.1. Мікропланшети після завершення субстратної реакції DAS-ELISA: планшет 1 - CLRV (жовте забарвлення свідчить про позитивну реакцію у зразках бузини); планшети 2 та 3 - відсутність реакції антиген-антитіло у зразках півоній

3.2.2. Результати тестування бузини на CLRV

Паралельно із зразками півоній на планшеті 1 було протестовано 13 зразків бузини (Sambucus nigra) на наявність CLRV. Результати наведено у Таблиці 3.3.

Таблиця 3.3 Результати DAS-ELISA на CLRV для зразків бузини

Зразок	Опис	OD (405 нм)	Результат
N1	Бузина, № 4, Київ	0,006	–
N2	Бузина, № 2, Київ	0,011	–
N3	Бузина, № 3, Київ	0,009	–
N4	Бузина, дерево 1, Київ. обл.	0,280	–
N5	Бузина, дерево 2, Київ. обл.	0,619	+
N6	Бузина, парк	0,623	+
N7	Бузина, Інне	0,612	+
N8	Бузина, № 40, Конотоп	0,593	+
N9	Бузина, Л.Т.	0,635	+
N10	Бузина, № 13, листки	0,613	+
N11	Бузина, № 13, квітки	0,637	+
N12	Бузина, № 12, листки	0,635	+
N13	Бузина, № 12, квітки	0,629	+
K–	Негативний контроль	0,003	–
K+	Позитивний контроль	0,646	+

Примітки: «+» - позитивний результат (OD ≥ 3× K–); «–» - негативний результат. Поріг позитивності: OD ≥ 0,009.

CLRV було виявлено у 10 з 13 зразків бузини (зразки N5–N13). Значення OD позитивних зразків становили 0,593–0,637, що у понад 200 разів перевищувало значення негативного контролю (0,003) і було порівнянним із значенням позитивного контролю (0,646). Три зразки (N1–N3, м. Київ) та зразок N4 (Київська обл.) показали негативний або проміжний результат.

Ці результати підтверджують валідність тест-системи DAS-ELISA для CLRV та свідчать про широке поширення цього вірусу серед бузини в різних регіонах України. Також вони узгоджуються з попередніми даними про виявлення CLRV у Sambucus nigra в Україні [22].

3.3. Обговорення результатів

Основним результатом дослідження є відсутність виявлення будь-якого з 11 тестованих вірусів у зразках 9 сортів півоній з колекції НБС ім. М.М. Гришка, незважаючи на наявність візуальних симптомів, характерних для

вірусного ураження. Цей результат потребує ретельного аналізу та інтерпретації.

Можливі причини негативних результатів. Отримані дані можна пояснити кількома гіпотезами, які не є взаємовиключними.

По-перше, збудником спостережуваних симптомів може бути вірус, що не входив до панелі тестування. DAS-ELISA є високоспецифічним методом, який виявляє лише ті антигени, до яких спрямовані антитіла у використаній тест-системі [18, 21]. У наших дослідженнях тестувалися 11 вірусів, тоді як загальний перелік вірусів, описаних на півоніях, значно ширший і включає понад 20 видів [24]. Зокрема, у панель не входили вірус мозаїки люцерни (AMV), вірус огіркової мозаїки (CMV), вірус плямистого в'янення томатів (TSWV), вірус некротичної затримки росту цикасів (CNSV) та нещодавно описані віруси, такі як вірус, асоційований з пожовтінням півоній (PYaCV), та вірус 1 півонії (PeV1) [23].

По-друге, низька концентрація вірусу в тканинах може перебувати нижче порогу чутливості методу DAS-ELISA. Відомо, що серологічні методи мають меншу чутливість порівняно з молекулярними (RT-PCR, qPCR). Показовим прикладом є робота Mishchenko та співавторів (2023), де DAS-ELISA на 12 вірусів дала негативний результат для півоній із вираженими симптомами ураження, і лише подальше тестування методами електронної мікроскопії та ПЛР у реальному часі виявило GLRaV-3 [21]. Аналогічна ситуація можлива і в нашому дослідженні.

По-третє, не можна виключити, що спостережувані симптоми мають невірусну етіологію. Кільцева плямистість, деформація листя та порушення росту можуть бути спричинені грибковими інфекціями, фітоплазмовими захворюваннями, дефіцитом мікроелементів, гербіцидним пошкодженням або абіотичним стресом [14, 16]. Диференціальна діагностика потребує додаткових досліджень з використанням молекулярних методів та мікологічного аналізу.

По-четверте, фаза інфекції та сезонна динаміка титру вірусу можуть впливати на результати серологічного тестування. Концентрація вірусних частинок у рослинних тканинах коливається залежно від фази вегетації, і час відбору зразків є критичним фактором для успішної діагностики [19]. Зразки було відібрано 10 червня 2025 року - у період активного цвітіння, коли основна частина ресурсів рослини спрямована на генеративні органи, що теоретично може знижувати титр вірусу у вегетативних тканинах.

Валідація тест-системи. Успішне виявлення CLRV у зразках бузини (10 з 13 зразків позитивні, з OD-значеннями, що у понад 200 разів перевищували негативний контроль) підтверджує працездатність тест-системи та коректність проведення DAS-ELISA. Позитивний контроль (бузина з підтвердженим CLRV) та негативний контроль (бузина без CLRV) показали очікувані результати, що виключає системну помилку у проведенні аналізу.

Порівняння з літературними даними. Отримані результати узгоджуються з тенденцією, описаною в літературі: стандартні серологічні панелі часто не виявляють збудників вірусних захворювань півоній. У дослідженні Mishchenko et al. (2023) тестування шести сортів півоній із вираженими симптомами на 12 поширених вірусів методом DAS-ELISA також не виявило жодного з них [7]. Лише розширений аналіз дозволив ідентифікувати GLRaV-3 - вірус, який раніше не вважався патогеном півоній. Vlasava et al. (2024) виявили коінфекцію TRV та CNSV у P. lactiflora за допомогою RT-PCR, підкресливши, що молекулярні методи є необхідним доповненням до серологічних [15].

Практичне значення результатів. Незважаючи на негативні результати DAS-ELISA, спостережувані візуальні симптоми вірусного ураження на 9 сортах півоній вказують на необхідність продовження діагностичних досліджень. Рекомендується проведення наступних кроків: тестування методом RT-PCR на розширену панель вірусів, включаючи CNSV, AMV, CMV, TSWV, PYaCV та PeV1; застосування методів секвенування

наступного покоління (NGS) для метагеномного аналізу вірому півоній; повторний відбір зразків у різні фази вегетації для врахування сезонної динаміки титру вірусу; мікологічний аналіз для виключення грибкової етіології симптомів.

Широке поширення CLRV серед бузини (77% зразків позитивні) є окремим науково значущим результатом, що підтверджує дані Mishchenko et al. (2021) [15] і свідчить про те, що S. nigra є важливим природним резервуаром CLRV в Україні. Враховуючи, що бузина часто зростає поряд із колекційними насадженнями у ботанічних садах, це може створювати ризик міжвидової передачі вірусу.

ВИСНОВКИ

1. Проведено візуальне обстеження колекційних насаджень півоній НБС імені М.М. Гришка НАН України. У 9 сортах (Mr. G.F. Hemerik, Judy Anne, Edwin C. Bills, Mrs. Wilder Bancroft, Gismonda, Lorelei, Casablanca, Полонез, Медярочка) виявлено симптоми, характерні для вірусного ураження: кільцеву плямистість листя, деформацію листкових пластин, нетипову морфологію листя та ознаки карликовості. Для сортів Полонез, Медярочка, Gismonda та Casablanca обстеження на наявність вірусних хвороб проведено вперше.

2. Методом DAS-ELISA проведено тестування 9 сортів півоній на наявність 11 вірусів: CLRV, TRV, PeAMV, RRSV, GLRaV-1, GLRaV-3, TNV, GLRaV-7, GFLV, TRSV та TBRV. Жоден з тестованих вірусних антигенів не було виявлено у зразках півоній: значення оптичної густини дослідних зразків перебували на рівні негативного контролю. Це свідчить про те, що збудник спостережуваних симптомів або не входить до панелі тестування, або його концентрація перебуває нижче порогу чутливості методу DAS-ELISA.

3. Паралельно проведено тестування 13 зразків бузини чорної (Sambucus nigra L.) на наявність вірусу кільцевої плямистості вишні (CLRV). Вірус виявлено у 10 з 13 зразків (77%) різного географічного походження, зі значеннями OD у 200 разів вищими за негативний контроль. Це підтверджує валідність застосованої тест-системи, широке поширення CLRV серед бузини в Україні та потенційну роль S. nigra як природного резервуару вірусу.

4. Негативні результати DAS-ELISA для півоній узгоджуються з літературними даними: у дослідженні Mishchenko et al. (2023) тестування півоній з вираженими симптомами на 12 поширених вірусів методом DAS-ELISA також не дало позитивних результатів, і лише застосування ПЛР у реальному часі виявило GLRaV-3. Це підкреслює обмеження серологічних методів та необхідність їх доповнення молекулярними підходами.

5. На підставі отриманих результатів рекомендовано: проведення тестування зразків методом RT-PCR на розширену панель вірусів (включаючи

CNSV, AMV, CMV, TSWV, PYaCV, PeV1); застосування метагеномного аналізу (NGS) для ідентифікації невідомих раніше збудників; повторний відбір зразків у різні фази вегетації; проведення мікологічного аналізу для диференціальної діагностики з грибковими захворюваннями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Hong D.-Y. Peonies of the World. Taxonomy and Phytogeography. Kew: Royal Botanic Gardens, 2010. 302 p.

2. Peony. Wikipedia. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Peony

3. Pantsyreva H.V. Дослідження сортових ресурсів трав'яних видів Paeonia L. в Україні. Scientific Bulletin of UNFU. 2018. Vol. 28, No. 8. P. 74–78.

4. Lu W., Hong C., Huang Z. et al. Virus Diseases of Peonies. Horticulturae. 2025. Vol. 11. P. 517.

5. Vlasava N.B., Michener D.C., Kharytonchyk S., Cortés-Ortiz L. Co-Infection of Tobacco Rattle and Cycas Necrotic Stunt Viruses in Paeonia lactiflora. Viruses. 2024. Vol. 16. P. 893.

6. Robertson N.L., Brown K.L., Winton L.M., Holloway P.S. First report of tobacco rattle virus in peony in Alaska. Plant Disease. 2009. Vol. 93. P. 675.

7. Mishchenko L.T., Konup L.O., Dunich A.A. et al. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. J. Plant Dis. Prot. 2023. Vol. 130. P. 189–198.

8. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 1977. Vol. 34. P. 475–483.

9. Rubio L., Galipienso L., Ferriol I. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. Front. Plant Sci. 2020. Vol. 11. P. 1092.

10. Maree H.J., Almeida R.P.P., Bester R. et al. Grapevine leafroll-associated virus 3. Front. Microbiol. 2013. Vol. 4. P. 82.

11. Li P., Shen J., Wang Z. et al. Genus Paeonia: A comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, pharmacological activities, clinical application, and toxicology. J. Ethnopharmacol. 2021. Vol. 269. P. 113708.

12. Колекція півоній. Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України. URL: https://www.nbg.kyiv.ua/

13. Garfinkel A.R., Chastagner G.A. Diseases of Peonies. In: McGovern R., Elmer W. (eds) Handbook of Florists' Crops Diseases. Springer, 2016. P. 31.

14. Dunich A., Mishchenko L., Andriichuk O. et al. First report of cherry leaf roll virus from Juglans regia in Ukraine. J. Plant Pathol. 2024. Vol. 106. P. 773.

15. Mishchenko L., Dunich A., Molodchenkova O., Hlushchenko L. First report of cherry leaf roll virus from Sambucus nigra in Ukraine. J. Plant Pathol. 2021. Vol. 103. P. 1077.

16. Lu W., Hong C., Huang Z. et al. Virus Diseases of Peonies. Horticulturae. 2025. Vol. 11. P. 517.

17. Hong D.-Y. Peonies of the World. Taxonomy and Phytogeography. Kew: Royal Botanic Gardens, 2010. 302 p.

18. Mishchenko L.T., Konup L.O., Dunich A.A. et al. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. J. Plant Dis. Prot. 2023. Vol. 130. P. 189–198.

19. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 1977. Vol. 34. P. 475–483.

20. Mishchenko L., Dunich A., Molodchenkova O., Hlushchenko L. First report of cherry leaf roll virus from Sambucus nigra in Ukraine. J. Plant Pathol. 2021. Vol. 103. P. 1077.

21. Lu W., Hong C., Huang Z. et al. Virus Diseases of Peonies. Horticulturae. 2025. Vol. 11. P. 517.

22. Hong D.-Y. Peonies of the World. Taxonomy and Phytogeography. Kew: Royal Botanic Gardens, 2010. 302 p.

23. Vlasava N.B., Michener D.C., Kharytonchyk S., Cortés-Ortiz L. Co-Infection of Tobacco Rattle and Cycas Necrotic Stunt Viruses in Paeonia lactiflora. Viruses. 2024. Vol. 16. P. 893.

24. Mishchenko L.T., Konup L.O., Dunich A.A. et al. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. J. Plant Dis. Prot. 2023. Vol. 130. P. 189–198.

25. Clark M.F., Adams A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 1977. Vol. 34. P. 475–483.

26. Rubio L., Galipienso L., Ferriol I. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. Front. Plant Sci. 2020. Vol. 11. P. 1092.

27. Garfinkel A.R., Chastagner G.A. Diseases of Peonies. In: McGovern R., Elmer W. (eds) Handbook of Florists' Crops Diseases. Springer, 2016. P. 31.