

## РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСНЫХ И ВИРУСОПОДОБНЫХ ПАТОГЕНОВ СЕМЕЧКОВЫХ КУЛЬТУР В УКРАИНЕ

Е. Н. УДОВИЧЕНКО, И. А. РЯБА, Л. В. ПАВЛЮК, И. В. ГРЫНЫК

Институт садоводства НААН Украины,  
ул. Садовая, 23, с. Новоселки, Киево-Святошинский р-н, Киевская обл., 03027, Украина,  
e-mail: k\_udovychenko@ukr.net

### АННОТАЦИЯ

Проведено исследование распространенности в Украине вирусов, виридов и фитоплазм семечковых культур методами ELISA и RT-PCR. Во всех исследованных областях на сортах и подвоях яблони и груши выявлены вирусы ACLSV, ASGV, ASPV, ArMV. В Киевской, Закарпатской и Донецкой областях диагностировали зараженность фитоплазмами. Установлено отсутствие в исследованных образцах ToRSV, TRSV, ASSVd, ADFVd и PBCVd. В результате тестирования отобраны растения-кандидаты в безвирусные клоны 32 сортов и 3 подвоев яблони, 13 сортов и 4 подвоев груши.

*Ключевые слова:* яблоня, груша, вирусы, вириды, фитоплазмы, Украина.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирусы являются системными патогенами семечковых культур, которые приводят к болезням с катастрофическими последствиями в садах во всем мире. Сегодня известно, по крайней мере, 30 вирусных и вирусоподобных агентов, способных поражать яблоню и грушу. Они оказывают значительное влияние на развитие деревьев и их урожайность. В связи с этим, в условиях интенсификации производства плодов и активного обмена генетическим материалом между странами, актуальной становится разработка национальных и международных мер контроля качества посадочного материала. Одним из элементов контроля вирусных болезней являются карантинные программы, предотвращающие распространение вирусов при перемещении растительного материала между государствами. Однако перечни схем сертификации, разработанные международными организациями по защите растений, включают в себя не только карантинные, но и опасные нерегулируемые организмы, вредоносные для определенных видов плодовых культур. Формирование таких списков невозможно без предварительного изучения фитосанитарного состояния существующих насаждений и определения уровня распространенности опасных вирусов, виридов, фитоплазм, бактерий, грибов и вредителей в каждой отдельной стране [2]. Европейской организацией защиты и карантина растений (EPPO) разработан стандарт по выращиванию тестируемого на отсутствие патогенов посадочного материала яблони, груши и айвы [7]. Согласно ему исходный сертифицированный посадочный материал яблони и груши должен быть свободным от ряда бактериальных и грибных возбудителей: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora* (OEPP/EPPO, 1992), *Pseudomonas* spp., *Armillariella mellea*, *Chondrostereum purpureum*, *Glomerella cingulata*, *Pezizula malicorticis* and *P. alba*, *Nectria galligena*, *Phytophthora* spp. Относительно вирусных и вирусоподобных патогенов, которые тоже подлежат контролю, основу европейской схемы сертификации для семечковых составляют вирусы хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), бороздчатости древесины яблони (ASGV), ямчатости древесины яблони (ASPV), мозаики яблони (ArMV), вириды рубцеватости кожицы яблок (ASSVd) и пузырчатого рака коры груши (PBCVd), а также фитоплазмы. Известно, что они являются наиболее распространенными в странах, входящих в состав EPPO. В Украине же имеются сведения о распространении перечисленных вирусов в отдельных регионах в насаждениях яблони и груши, но фактически отсутствуют данные о циркуляции виридов и фитоплазм семечковых. Кроме перечисленных патогенов, в связи с накоплением данных об обнаружении новых вирусных и вирусоподобных организмов семечковых культур, недавно Европейской организацией по безопасности пищевых продуктов (ESFA) был пересмотрен статус 17 патогенов, которые не входят в сертификационную схему. Среди них, важно отметить, вирусы кольцевой

пятнистости томата и табака, которые относятся к ограниченно распространенным организмам на территории стран-членов ЕРРО и ранее были обнаружены на других культурах в Украине.

Таким образом, учитывая результаты предыдущих исследований украинских ученых и опыт европейского сообщества, мы обратили внимание на наиболее опасные и распространенные патогены семечковых культур с целью уточнения перечня патогенов, подлежащих контролю в Украине в процессе сертификации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в отделе вирусологии, оздоровления и размножения плодовых и ягодных культур Института садоводства НААН Украины в рамках договора № ДЗ/68 с МОН Украины. Отбор образцов яблони, груши и их подвоев проводили в разных типах насаждений садоводческих и питомниководческих хозяйств Киевской, Херсонской, Кировоградской, Донецкой, Закарпатской, Запорожской, Тернопольской, Николаевской, Волынской, Львовской и Черновицкой областей Украины. Образцы проверяли на наличие вирусов ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV, кольцевой пятнистости томатов (ToRSV), кольцевой пятнистости табака (TRSV), фитоплазмы пролиферации яблони и отмирания груши, виридов ASSVd, ямчатости плодов яблони (ADFVd), PBCVd.

Детекцию вирусов в растительном материале проводили методом DAS-ELISA с использованием тестовых систем производства Loewe Phytodiagnosics (Германия) и Bioreba (Швейцария) согласно протоколам производителей.

Экстракцию тотальной нуклеиновой кислоты из образцов для диагностики вирусов, виридов и фитоплазм проводили с помощью коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя с некоторыми модификациями и/или СТАВ-методом.

Контроль качества выделенных нуклеиновых кислот проводили с помощью электрофореза в 1,7 %-ном агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1x TAE буфере или с использованием спектрофотометра Denovix MS-11 при длине волны A260 и оценивали загрязненность препаратов полисахаридами при A260/A230 и белками при A260/A280.

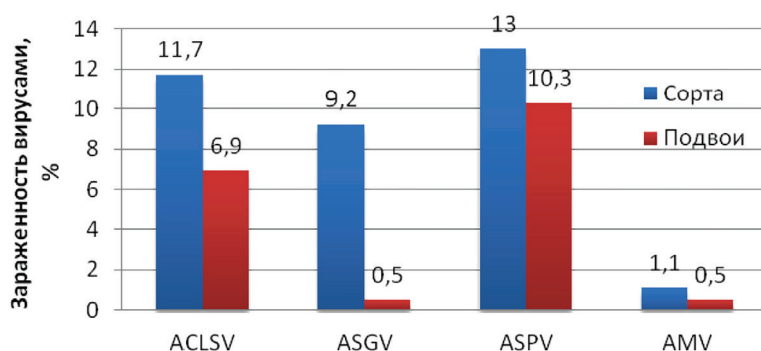
ОТ-ПЦР для выявления вирусов ASPV, ASGV, ACLSV, ApMV [9], а также виридов ASSVd, ADFVd [4], PBCVd [8] в образцах проводили с праймерами к нуклеотидным последовательностям каждого из патогенов. Контроль обратной транскрипции проводили с использованием праймеров к гену *Nad5* [9]. Постановку ОТ-ПЦР проводили с помощью Verso 1-Step RT-PCR kit (Thermo Scientific) в соответствии с рекомендациями производителя. ПЦР для детекции фитоплазм проводили с использованием коммерческого набора Universal Phytoplasma nested PCR Set (Loewe Phytodiagnosics) и/или с праймерами, рекомендованными Международной конвенцией по защите растений (IPPC) [6].

Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1,7 %-ном агарозном геле с маркерами молекулярного веса DNALadder 1kb plus (Thermo Fisher Scientific) или ДНК-маркер 100 kb + 1,5kb + 3kb (Сибэнзим).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Изучение распространенности вирусов и виридов яблони и груши в Украине.** Нами был проведен отбор образцов сортов и подвоев семечковых культур в 20 хозяйствах 12 областей Украины. Всего было проверено 900 образцов, из них 618 образцов сортов яблони, 203 – подвоев яблони, 54 – сортов груши и 25 – подвоев груши. Отбор материала проводили в период активного роста растений. Все образцы были проверены методом иммуноферментного анализа на наличие вирусов ACLSV, ASPV, ASGV и ApMV, каждый третий образец тестировали на отсутствие ToRSV и TRSV. Часть образцов также была проверена на наличие ACLSV, ASPV, ASGV и ApMV методом ОТ-ПЦР.

Результаты исследования показали высокий уровень распространения вирусов, входящих в европейскую систему сертификации, в разных типах насаждений семечковых культур во всех регионах, где проводился отбор образцов.



Распространение вирусов в насаждениях сортов и подвоев яблони

В сортовых насаждениях яблони наиболее распространенным оказался вирус ямчатости древесины яблони. Заражение этим вирусом вызывает частичную несовместимость сорто-подвойных комбинаций в питомнике, что приводит к уменьшению количества и ухудшению качества посадочного материала. В плодоносящих насаждениях инфицированные деревья имеют пониженную устойчивость к биогенным и абиогенным факторам внешней среды и падение качества плодов. Так, среди протестированных образцов сортов яблони ASPV был обнаружен в 13,0 %, в то время как другими вирусами было инфицировано меньше проверенных образцов: ACLSV – 11,7 %, ASGV – 9,2 %, ApMV – 1,1 % (см. рисунок). Наименьшая инфицированность вирусом мозаики яблони, скорее всего, связана с проявлением симптомов инфицирования этим вирусом и отбраковкой инфицированных растений еще на этапе отбора клонов для размножения. Встречалась также комплексная инфекция двумя, тремя и даже четырьмя вирусами одновременно. У 3,3 % образцов выявляли комплексное инфицирование ACLSV + ASPV, по 0,5 % образцов было заражено комплексами ASGV + ASPV, ACLSV + ASGV, ACLSV + ApMV, ACLSV + ASGV + ASPV, одновременное инфицирование ASGV + AMV было обнаружено у 0,2 % исследуемого материала. В одном образце сорта Голден Делишес были диагностированы все четыре вируса одновременно. Комплексные инфекции были обнаружены у сортов Айдаред, Голден Делишес, Гала, Орион, Скифское золото, Аскольда, Эдера и Злато.

В целом уровень зараженности вирусами проверенных образцов сортов яблони составил около 28 %. В сравнении с данными, полученными в 2004 г., следует отметить снижение уровня инфицирования именно сортов яблони [1], что связано, очевидно, с частичным обновлением насаждений и сортимента в основном за счет иностранных сортов из стран, где схемы сертификации эффективно работают уже на протяжении десятилетий. Несмотря на снижение общего уровня инфицирования, по отдельным сортам ситуация остается критической. Так, образцы сортов Гарант, Эдера и Скифское золото были инфицированы на 66–76 %, у сортов Гала, Голден Делишес, Орион, Айдаред выявляли 23–33 % инфицированных образцов.

Подвои яблони в целом были инфицированы на 15,5 %, что демонстрирует значительное ухудшение их фитовирусологического состояния, как следствие несоблюдения основных агротехнологических приемов в хозяйствах. Как и в сортах яблони, доминировал вирус ASPV – 10 % тестированных образцов. В комплексе встречалось инфицирование только ACLSV + ASPV – 2,9 % образцов.

Образцы сортов груши были заражены в 6 % случаев. Вирус ASPV был обнаружен у 3 % образцов, ACLSV – у 2 %. Достаточно низкие показатели зараженности по сравнению с сортами яблони, вероятно, связаны со значительно меньшим объемом выборки и целенаправленным отбором образцов с визуально здоровых растений для последующего создания фонда безвирусных клонов. Среди четырех диагностируемых подвоев груши были обнаружены единичные инфицированные образцы Айвы С.

Еще с 1976 г. в мире отмечают спорадические случаи инфицирования семечковых культур вирусом кольцевой пятнистости томатов, который вызывает некроз в месте прививки, пожелтение жилок и отмирание листьев [10], и вирусом кольцевой пятнистости табака, хотя и менее

вредоносным, но способным инфицировать широкий круг хозяев. Эти вирусы ранее были диагностированы в Украине на других хозяевах. Учитывая наличие переносчиков этих вирусов, нами был проведен скрининг образцов сортов и подвоев яблони и груши. Тестирование около 300 образцов для выявления ToRSV и TRSV продемонстрировало их отсутствие в проверенных насаждениях семечковых культур.

С целью выяснения уровня распространения виридов в садовых агроценозах семечковых культур Киевской области были проведены визуальные обследования плодоносных насаждений яблони и груши в осенний период сбора урожая для идентификации вероятных симптомов поражения на плодах. Было отобрано 40 образцов, которые имели симптомы ямчатости, не характерную для сорта окраску плода, мелкоплодность, деформацию плодов, растрескивание коры.

Из всех отобранных образцов была выделена тотальная РНК и проведена ОТ-ПЦР на наличие виридов ASSVd, ADFVd и PBCVd. Отдельно была поставлена ОТ-ПЦР с праймерами к растительному гену *Nad5* для подтверждения качества выделенной РНК и ее пригодности для постановки реакции. Ни в одном из образцов не было обнаружено исследуемых виридов, что свидетельствует о другой возможной природе выявленных симптомов.

**Детекция фитоплазм семечковых культур.** Фитоплазмы широко распространены во всем мире и способны поражать тысячи видов растений. В то же время информация об их распространении в Украине на плодовых культурах очень ограничена.

Все образцы яблони и груши, отобранные в процессе мониторинга вирусных болезней, не имели визуальных симптомов заражения фитоплазмами, однако были проверены на наличие латентного инфицирования этим патогеном. Для детекции отбирали черешки или жилки листьев, богатые на проводящие ткани. Было показано, что хоть СТАВ-метод и обеспечивал высокий выход ДНК, чувствительность обнаружения фитоплазмы была выше при использовании коммерческого набора Genomic DNA Purification Kit. Эффективность использования Universal Phytoplasma nested PCR Set для ПЦР и праймеров, рекомендованных IPPC, была на одном уровне.

В результате исследований было выявлено инфицирование фитоплазмой образцов сортов яблони Гала и Розела, которые были отобраны в Закарпатской области, подвоя М-9 из Донецкой области и сортов груши Золотоворитская, Бере Киевская и Бере Боск из Киевской области. Всего было заражено 1,6 % проверенных образцов. Таким образом, было подтверждено требование сертификационной схемы об обязательной диагностике исходных клонов семечковых культур на наличие скрытой инфекции фитоплазмами пролиферации яблони и отмирания груши.

По результатам тестирования удалось отобрать свободные от системных патогенов клоны 32 сортов яблони (Айдаред, Голден Делишес, Гала, Луна, Орион, Розела, Рекарда, Ред Топаз, Ренора, Реколор, Сириус, Флорина, Ренет Симиренко, Скифское золото, Богачка, Аскольда, Эдера, Тодес, Настя, Амулет, Папировка, Теремок, Радогость, Гарант, Катерина, Перлына Киева, Слава победителям, Юбилейная МИС, Долго, Колорит, Наследница юга, Фаворит), 13 сортов груши (Конференция, Янис, Пектораль, Виктория, Весильна, Золотоворитская, Маргарита, Мария, Кучерянка, Молдавская Летняя, Бере Боск, Говерла, Бере Киевская), 3 подвоев яблони (ММ 106, М-9, 54-118) и 4 подвоев груши (ИС 2-10, ИС 4-12, ВА-29, Айва С).

## ВЫВОДЫ

1. Обследования насаждений семечковых культур выявили значительное распространение вирусов ACLSV, ASPV, ASGV, ArMV и фитоплазм, составляющих основу мировых схем сертификации посадочного материала яблони и груши, которые должны подлежать обязательному контролю в процессе сертификации посадочного материала в Украине.

2. Установлено, что преобладающими вирусами являются ASPV и ACLSV, выявленные у 11 и 10 % образцов соответственно.

3. Показано, что в исследованных насаждениях семечковых культур отсутствуют «нетипичные для Европейского союза» вирусы ToRSV и TRSV и раньше не диагностированные вириды ASSVd, ADFVd, PBCVd.

4. Молекулярно-генетическими методами подтверждена зараженность фитоплазмами 1,6 % исследованных бессимптомных растений семечковых культур.

## ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Господарик, А. В. Діагностика вірусів плодових культур в умовах України / А. В. Господарик, К. М. Удовиченко, В. П. Поліщук // Наук. зап. НаУКМА. Сер. Біологія та екологія. – 2005. – Т. 43. – С. 51–53.
2. Barba, M. Control of pome and stone fruit virus diseases / M. Barba, V. Ilardi, G. Pasquini // *Adv. Virus Res.* – 2015. – № 91. – P. 47–83.
3. Deng, S. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes / S. Deng, D. Hiruki // *Journal of Microbiological Methods.* – 1991. – Vol. 14. – P. 53–61.
4. Other Apscaviroids Infecting Pome Fruit Trees / F. Di Serio [et al.]. In: Hadidi A, Flores R, Randles J, Palukaitis P (eds.). *Viroids and Satellites.* Academic press. – London UK. – 2017b. – P. 229–241.
5. EPPO Standards. PM 4/27(1) [Electronic resource] Pathogen-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia. – Mode of access: <http://archives.eppo.int/EPPOStandards/certification.htm>. – Date of access: 30.04.2020.
6. ISPM 27. Annex 12. Phytoplasmas (2016). Rome, IPPC, FAO. – Mode of access: [https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2016/04/DP\\_12\\_2016\\_En\\_2016-04-14.pdf](https://www.ippc.int/static/media/files/publication/en/2016/04/DP_12_2016_En_2016-04-14.pdf). – Date of access: 30.04.2020.
7. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy / I. M. Lee [et al.] // *Phytopathology.* – 1995. – Vol. 85. – P. 728–735.
8. Loreti, S. Identification and characterization of an Italian isolate of Pear blister canker viroid / S. Loreti, F. Fagioli, M. Barba // *Journal of Phytopathology.* – 1997. – Vol. 145. – P. 541–544.
9. Menzel, W. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control / W. Menzel, W. Jelkmann, E. Maiss // *J Virol Methods.* – 2002. – № 99. – P. 81–92.
10. Moini, A. A. Identification of Tomato ringspot virus (ToRSV) on apple in Iran / A. A. Moini // *Australasian Plant Disease Notes.* – 2010. – Vol. 5. – P. 105–106.
11. Virological assessment of stock planting material of apple and raspberry cultivars / J. Stankienė [et al.] // *Žemdirbystė Agriculture.* – 2012. – Vol. 99, № 1. – P. 93–98.

## DISTRIBUTION OF VIRUS AND VIRUS-LIKE PATHOGENS OF POME FRUITS IN UKRAINE

E. N. UDOVYCHENKO, I. A. RIABA, L. V. PAVLIUK, I. V. HRYNYK

### Summary

A study of the occurrence in Ukraine of viruses, viroids and phytoplasmas of pome fruits by ELISA and RT-PCR methods was carried out. In all studied regions, ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV viruses were detected on cultivars and rootstocks of apple and pear. In Kyiv, Zakarpattia and Donetsk regions phytoplasma infection was diagnosed. The absence of ToRSV, TRSV, ASSVd, ADFVd, and PBCVd in the studied samples was determined. As a result of testing, candidate nuclear-stock plants of 32 apple cultivars and 3 apple rootstocks, 13 pear cultivars and 4 pear rootstocks were selected.

*Keywords:* apple, pear, viruses, viroids, phytoplasma, Ukraine.

*Поступила в редакцію 12.05.2020 з.*