

# ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ВІРУСУ

## скручування листа виноградної лози на виноградниках Одеської області

**Мета.** Встановлення наявності вірусної хвороби виноградної лози (скручування листа) на виноградниках в Одеській області, а також ідентифікація збудників цієї хвороби. **Методи.** Обстеження виноградних насаджень на наявність симптомів вірусних хвороб. Для ідентифікації вірусу скручування листа виноградної лози і виявлення його серотипів застосовували молекулярно-біологічний метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) з гелелектрофоретичною детекцією. **Результати.** Виявлено кущі виноградних рослин з характерними симптомами скручування листа, а саме скручування листкової пластинки, зміна забарвлення листа від зеленого до жовтого у біологічних сортів винограду і від зеленого до червоного — у червоноягідних. Ідентифікація збудників скручування листа показала наявність 1-го і 3-го серотипів вірусу скручування листа виноградної лози. Встановлено, що серед всіх виявлених серотипів вірусу скручування листа винограду найбільш поширеним є 3-й серотип. Також виявлено кущі винограду сорту Одеський чорний з нетиповими для вірусу скручування симптомами скручування листа. Методом ЗТ-ПЛР ідентифіковано вірус 9-го серотипу, який раніше не зустрічався на виноградниках Півдня України. **Висновки.** В результаті фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Одеської області виявлено вірусну хворобу виноградної лози — скручування листа. Методом ЗТ-ПЛР з гелелектрофоретичною детекцією встановлено, що виноградні рослини були заражені вірусом скручування листа виноградної лози 1-м і 3-м серотипами. Вперше ідентифіковано 9-й серотип вірусу скручування листа винограду на виноградних насадженнях в Одеській області.

**віруси винограду, вірус скручування листа винограду, ЗТ-ПЛР, виноград**

---

**А.І. КОНУП,**  
науковий співробітник  
**В.Л. ЧИСТЯКОВА,**  
старший науковий співробітник  
**Л.О. КОНУП,**  
кандидат біологічних наук  
**Н.І. НИКОЛАЄВА,**  
молодший науковий співробітник  
Національний науковий центр  
«Інститут виноградарства  
і виноробства ім. В.Є. Таїрова»  
НААН України,  
40-річчя Перемоги, 27, м. Одеса, 65496  
e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

---

Віруси виноградної лози дуже впливають на якість виноградних рослин та продукції виноградарства, при цьому знижується цукристість, вихід саджанців у шкільці, а також довговічність виноградних кущів. Виробництво садивного матеріалу із заражених вірусами прищеп і підщеп спричиняє поширення хвороби на виноградних насадженнях, що зумовлює зниження ефективності експлуатації виноградників та збільшення економічних затрат. До шкідливих вірусів рослин винограду, що входять до системи санітарної сертифікації садивного матеріалу, відносяться: вірус скручування листа винограду з 1-го по 9-тий серотип — *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus* (1-9) (*GLRaV1-9*), вірус коротковузля винограду — *Grapevine Fanleaf Virus* (*GFLV*), вірус мармуровості листа винограду — *Grapevine Fleck Virus* (*GfKV*), вірус А винограду — *Grapevine Virus A* (*GVA*) і вірус В винограду — *Grapevine Virus B* (*GVB*) комплексу борознистості деревини виноградної лози — *Rugose wood complex* (*RWC*). Визнано, що в Європі вірус скручування листа винограду за шкідливістю стоїть на другому місці після ві-

русу коротковузля винограду, а в США, Австралії та Новій Зеландії є найбільш загрозливою хворобою. Вірус скручування листа винограду спричиняє зменшення вмісту цукру в ягодах на 16—20%, а збитки від втрати врожаю становлять 10—48% [1]. Класифікація серотипів вірусу скручування листа винограду ґрунтується на відмінностях у розмірі вірусних частинок і молекулярної маси капсидного білка [2]. Симптоми хвороби у вигляді скручування листа, починають проявлятися у серпні і прогресують до кінця вегетаційного періоду. В екстремальних випадках таке листя скручується в трикутну форму, листкові пластинки, зазвичай, забарвлюються в колір від блідо-жовтого до світло-бурого і нагадують передчасну осінню забарвленість. Кущі слабнуть, цукор ягід знижується. Ослаблення кущів стає помітним тільки на пізній стадії хвороби. У сортів з червоними ягодами, таких, як Каберне Совіньйон, Мерло рожеве, Піно нуар, Малбек, вірус викликає передчасне почервоніння листкових пластинок, за винятком вузької смужки вдовж головних жилок, а у сортів з білими ягодами, такими, як Шасла біла і Шардоне, листя мають жовте забарвлення. Але не завжди симптоми вірусних хвороб збігаються з ураженістю рослин цими збудниками. Тому необхідно проводити ідентифікацію вірусів виноградних рослин лабораторними методами, такими як ЗТ-ПЛР.

**Мета роботи.** Виявлення вірусної хвороби виноградної лози — скручування листа на виноградниках Одеської області.

**Завдання роботи.** Провести обстеження виноградних насаджень в Одеській області на наявність симптомів скручування листа і ідентифікувати збудника цієї хвороби.

**Методика досліджень** — фітосанітарне обстеження виноградних



насаджень. Зразки виноградних рослин відбирали за зовнішніми симптомами: скручування листя, хлороз, зміна забарвлення, відставання у рості, укорочення міжвузля, деформація листової пластинки. Відбір, зберігання і підготовку зразків рослин винограду проводили згідно із стандартом ISO 16578:2013 [3]. Для ідентифікації вірусів винограду використовували класичну ЗТ-ПЛР. Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно з методикою [4, 5]. Віруси РНК виділяли згідно з методикою [6, 7]. Для класичної ЗТ-ПЛР використовували наступні праймери [8]: до вірусу скручування листя 1-го серотипу (GLRaV1) — LR1hsp70-417F/LR1hsp70-737R, розмір продукту 320 п.о.; до вірусу скручування листя 2-го серотипу — (GLRaV2):LR2-L2/F LR2-U2/R, розмір продукту 331 п.о.; до вірусу скручування листя

3-го серотипу — (GLRaV3): LC1/F LC2/R, розмір продукту 546 п.о.; до вірусу скручування листя 4-го серотипу — (GLRaV4): LR4-HSPV/F LR4-HSPC/R, розмір продукту 319 п.о.; до вірусу скручування листя 5-го серотипу — (GLRaV5): LR 5HSPV/F LR5HSPC/R, розмір продукту 272 п.о.; до вірусу скручування листя 9-го серотипу — (GLRaV9): LR9-F/F LR9-R/R TCATTCCACCACTGCTTGAAC, розмір продукту 393 п.о. Синтез праймерів здійснений за нашим замовленням компанією Fermentas (Литва). В якості позитивного контролю використано біологічний матеріал тест-наборів для ІФА, негативного контролю — деіонізовану воду. Зворотну транскрипцію проводили в термостаті «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія) при 42°C протягом 60 хв, або при 52°C — 30 хв. [4]. Ампліфікування проводили в про-

грамованому ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4- ПЦР-01 (НПО «ДНК-Технологія», Росія). Ампліфікування включало 35 циклів — відпал: денатурація — 94°C/30 сек, відпалювання праймерів — 56°C/45 сек, синтез гена — 72°C/60 сек, 1 цикл — елонгація, заключний: 94°C/30 сек, 56°C/45 сек, 72°C/7 хв [4]. Виявлення ампліфікатів проводили методом електрофорезу в 1,5% агарозному гелі (ТВЕ-буфер, етидій бромід) протягом 40 хв при силі електричного струму 60 мА. Використовували маркер довжини фрагментів ДНК 50-1000 п.н. (*Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*). Гель візуалізували і фотографували за допомогою відео системи Mintron в ультрафіолетовому випромінюванні (довжина хвилі 312 нм).

Для ідентифікації вірусу скручування листя винограду, після



Рис. 1. Кущі винограду з симптомами скручування листя:

а — білогігідний сорт Сухоліманський білий; б — червоногігідний сорт Каберне Совіньйон (Одеська обл., 2016 р.)



закінчення ензиматичної ампліфікації фрагмента кДНК амплікони очищали від не включених нуклеозидтрифосфатів і праймерів за допомогою набору GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Литва).

Секвенування ампліфікованої ділянки кДНК вірусу *GLRaV* (розміром 393 н.п.) проводили за допомогою тест-набору для секвенування *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction ver. 3.1 (Applied Biosystems)* з використанням флуоресцентно мічених дидезоксинуклеотидтрифосфатів з праймерами до 9-го серотипу за допомогою термоциклера T100 (Bio-Rad). Продукти реакції секвенування очищували на колонках CentriSep (Applied Biosystems, США). Капілярний електрофорез продуктів секвенування проводили за допомогою ДНК-аналізатора ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США) з використанням полімеру *NanoPOP7 (Nimagen, Нідерланди)*. Аналіз нуклеотидної послідовності виконували за допомогою програми *Sequencing Analysis (версія 5.4)* (роботу здійснювали за участю колег із Російської академії наук Південного наукового центру).

**Результати досліджень.** За фітосанітарного обстеження промислових виноградних насаджень на початку літа в Одеській області були виявлені кущі винограду сортів Шардоне, Сухолиманський білий і Піно нуар, Каберне Совіньйон з симптомами вірусної хвороби скручування листя винограду. Характерними симптомами цієї хвороби є скручування листя, які приймали форму трикутника і залежно від сорту змінювали колір від зеленого до жовтого у білоягідних сортів винограду (рис. 1 а) та від зеленого до червоного у червоноягідних сортів (рис. 1 б). Цукор в ягодах знижувався, а кущі виноградних рослин слабли і потім гинули. Навесні симптоми цієї інфекції не проявлялися. Прояви скручування листя винограду можуть мати різні ознаки залежно від пори року, сорту і умов навколишнього середовища. Симптоми прояву вірусних хвороб є першим кроком для діагностики, але симптоми не завжди відповідають наявності вірусу в цих рослинах. Симптоми скручування листя мають фітоплазмові хвороби — почорніння деревини винограду і

золотисте пожовтіння листя винограду. Тому для діагностики вірусних хвороб необхідно проводити лабораторні випробування. З кущів винограду, що мали симптоми вірусних хвороб, матеріал відбирали для діагностики та ідентифікації збудників.

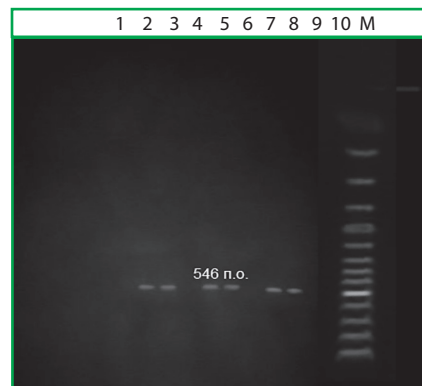
Для ідентифікації вірусу скручування листя винограду проводили скринінг по різних парах праймерів [7].

Під час проведення ЗТ-ПЛР з гелі-електрофоретичною детекцією було виявлено вірус скручування листя винограду 1-го (рис. 2) і 3-го серотипів (рис. 3) в рослинах



**Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ЗТ-ПЛР вірусу скручування листя 1-го серотипу:**

- 1, 8 — позитивні зразки сорту Шардоне;
- 2 — негативний контроль (H<sub>2</sub>O деіонізі);
- 3, 4 — негативні зразки сорту Шардоне;
- 5, 6, 7 — негативні зразки сорту Совіньйон білий;
- 10, 11 — позитивні зразки сорту Сухолиманський білий;
- 12, 13 — позитивні зразки сорту Іршаї Олівер;
- 14 — позитивний контроль (позитивний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія); маркер довжини фрагментів ДНК 50-1000 н.н. (Teruo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder)



**Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації ЗТ-ПЛР вірусу скручування листя 3-го серотипу:**

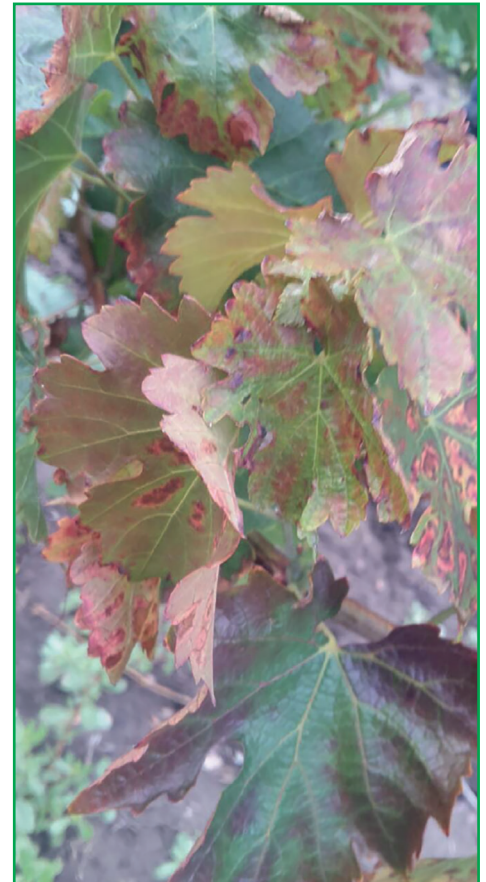
- 1, 2 — позитивні зразки сорту Шардоне;
- 4 — позитивний зразок сорту Сухолиманський білий;
- 7, 8 — позитивні зразки сорту Іршаї Олівер;
- 3, 6 — негативний контроль (H<sub>2</sub>O деіонізі);
- 5 — позитивний контроль (позитивний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія),
- 9, 10 — негативні зразки сорту Шардоне;
- маркер довжини фрагментів ДНК 50-1000 н.н. (Teruo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder)

сортів Каберне Совіньйон, Іршаї Олівер, Сухолиманський білий, Шардоне.

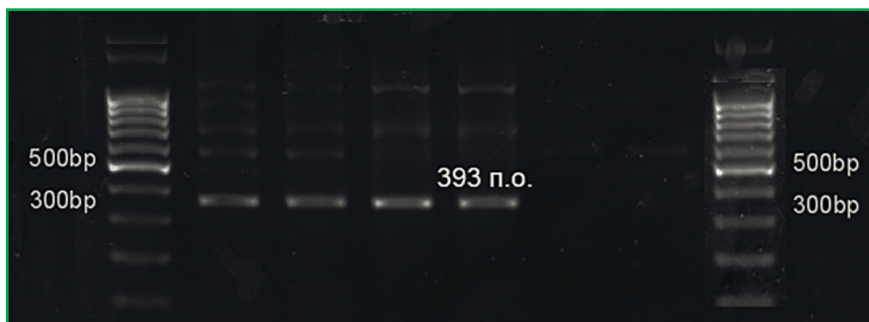
В результаті ідентифікації вірусу скручування листя у виноградних рослинах з симптомами вірусної хвороби встановлено, що сорти винограду сортів Іршаї Олівер, Сухолиманський білий, Шардоне були заражені вірусом скручування листя 1-го і 3-го серотипів одночасно, це підтверджує їх філогенетичну спорідненість [8, 9].

За фітосанітарного обстеження виноградників в Одеській області виявлено кущі винограду сорту Одеський чорний, клон 11 з нетиповими для вірусу скручування листя симптомами скручування листя (рис. 4).

Скринінгом по всіх парах праймерів до різних серотипів вірусу скручування встановлено, що виявлений вірус скручування належить до 9-го серотипу вірусу скручування листя виноградної лози (рис. 5). Раніше цей серотип у південному регіоні не ідентифікувався. Очевидно, серотип віру-



**Рис. 4. Кущ винограду сорту Одеський чорний, клон 11 з симптомами вірусу скручування листя (Одеська обл., 2013 р.)**



**Рис. 5. Електрофореграма фрагмента РНК вірусу скручування листя 9-го серотипу (GLRaV9). Маркер довжини фрагментів ДНК 100-1000 п.н. (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)**

су скручування листя виноградної лози було завезено із зараженим садивним матеріалом.

Таким чином, за ідентифікації вірусу скручування листя виноградної лози встановлено, що сорти виноградної рослини були заражені вірусом скручування 1-го, 3-го і 9-го серотипів.

## ВИСНОВКИ

В результаті фітосанітарного обстеження виноградної насаджень Одеської області виявлено вірусну хворобу виноградної лози — скручування листя. Методом ЗТ-ПЛР з гелелектрофоретичною детекцією встановлено, що виноградні рослини заражені вірусом скручування листя виноградної лози 1-го і 3-го серотипів. Вперше ідентифіковано 9-й серотип вірусу скручування листя винограду на виноградних насадженнях в Одеській області.

## ЛІТЕРАТУРА

- Almeida R.P.P., Daane K., Bell V. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*. 2013. Vol. 4. P. 94. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>
- Esteban A., Engel E. A., Escobar P. F. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*. 2010. Vol. 163. P. 445—451.
- Molecular biomarker analysis — General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). 2013. ISO 16578. URL: <http://www.eppo.org>
- Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковозуля та скручування листя. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т. 67. №1. С. 41—48.
- Rowhani A. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. *Proceedings of XIII International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine*. Adelaide. 2000. P. 82.
- White E.J., Venter M., Hiten N.E., and Bur-

ger J.T. Modified Cetyltrimethylammonium bromide method improves robustness and versatility: the benchmark for plant RNA extraction. *Biotechnology Journal*. 2008. Vol. 3(11). P. 1424—1428.

7. Fatima Osama, Christian Leutenegger, Deborah Golino, Adib Rowhani. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 149. P. 292—299.

8. Жунько І.Д., Ліманська Н.В., Мілкус Б.Н., Іваниця В.О. Віруси та вірусні хвороби винограду (VITIS SP.). *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. № 3. С. 6—17.

9. Guta I.C., Buciumeanu E.C., Gheorghie R.N., Teodorescu A. Solutions to eliminate Grape vine leafroll-associated virus serotype 1+3 from Vitis vinifera cv. Rabai Magaraci. *Romanian Biotechnological Letters*, 2010. Vol. 15. P. 72—78.

**Конуп А.И., Чистякова В.Л., Конуп Л.А., Николаева Н.И.**

Национальный научный центр «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова» НААН Украины, 40-лет Победы, 27, г. Одесса, 65496, e-mail: [lkmicrobiol@ukr.net](mailto:lkmicrobiol@ukr.net)

## Виявлення і ідентифікація вірусу скручування листя виноградної лози на виноградниках Одеської області

**Цель.** Обнаружение вирусной болезни виноградної лози — скручування листя на виноградниках в Одеської області, а також ідентифікація возбудителів цієї хвороби. **Методы.** Обследование виноградных насаждений на наличие симптомов вирусных болезней. Для идентификации вируса скручування листя виноградної лози и выявления его серотипов применяли молекулярно-биологический метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и детекцией с помощью гелелектрофореза. **Результаты.** В Одеськой области обнаружены кусты виноградної лози с характерными симптомами скручування листя, а именно скручування листовой пластинки, изменение окраски листя от зеленого до желтого у белоягодных сортов винограда и от зеленого до красного — у краснаягодных. Идентификация возбудителей скручування листя показала наличие 1-го и 3-го серотипов вируса скручування листя виноградної лози. Установлено, что среди всех выявленных серотипов вируса скручування листя винограда наиболее распространенным является 3-й серотип. Также были обнаружены кусты винограда сорта

Одесский черный с нетипичными для вируса скручування листя симптомами. Методом ОТ-ПЦР ідентифіцирован вирус 9-го серотипа, который раньше не встречался на виноградниках Юга Украины. **Выводы.** В результате фитосанитарного обследования виноградных насаждений в Одеськой области выявили вирусную болезнь виноградної лози — скручування листя. Методом ОТ-ПЦР с гелелектрофоретической детекцией установлено, что виноградные растения были заражены вирусом скручування листя виноградної лози 1-го и 3-го серотипов. Впервые ідентифіцирован 9-й серотип вируса скручування листя винограда на виноградных насаждениях в Одеськой области.

**вируси винограда, вирус скручування листя винограда, ОТ-ПЦР, виноград**

**Konup A., Chistyakova V., Konup L., Nikolaeva N.**

National Scientific Center «Institute of viticulture and winemaking named after V.E. Tairov» NAAS, 27, 40 years of Victory, Odessa, Ukraine, 65496, e-mail: [lkmicrobiol@ukr.net](mailto:lkmicrobiol@ukr.net)

## Detection and identification of the virus Grapevine Leaf Roll-Associated Virus of the vine in the vineyards of the Odessa region

**Goal.** Detection of viral disease of the vine — twisting leaves in the vineyards in the Odessa region, as well as identification of the causative agents of this disease. **Methods.** Examination of grape plantations for the presence of symptoms of viral diseases. To identify the virus twisting the leaves of the vine and identify its serotypes used molecular-biological method of polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) and detection using gel electrophoresis. **Results.** In the Odessa region, bushes of grape plants were found with characteristic symptoms of leaf curling, namely leaf blade curling, leaf color change from green to yellow in white-berry grape varieties and from green to red in red-berry. Identification of leaf twisting pathogens showed the presence of the 1st and 3rd serotypes of the vine twisting virus. It was established that among all the identified serotypes of the virus of twisting the leaves of the vine the most common is the 3rd serotype. Grape bushes of the Odessa black variety were also found with symptoms that are not typical for a curling virus. Using RT-PCR, a virus of the 9th serotype was identified that had not previously been seen in the vineyards of southern Ukraine. **Conclusion.** As a result of a phytosanitary of grape plantations in the Odessa region, a viral grapevine disease, twisting of leaves, was revealed. Using RT-PCR with gel electrophoretic detection, it was established that the grape plants were infected with the virus of twisting the leaves of the vine of the 1st and 3rd serotypes. For the first time identified the 9th serotype of the virus twisting the leaves of grapes on grape plantations in the Odessa region.

**grape viruses, of the grapevine leaf roll-associated virus, RT-PCR, grapes**

Рецензент:

Н.М. Зеленьська,  
доктор сільськогосподарських наук,  
ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» НААН  
Надійшла 25.01.2019 р.