

УДК 634.8:632.38

**ДІАГНОСТИКА ВІРУСІВ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ ВИНОГРАДУ І
КОРОТКОВУЗЛЯ В ПРОЦЕСІ ВИРОБНИЦТВА СЕРТИФІКОВАНОГО
САДИВНОГО МАТЕРІАЛУ ВИНОГРАДУ**

А. І. КОНУП, науковий співробітник

Л. О. КОНУП, кандидат біологічних наук,

В. Л. ЧИСТЯКОВА, старший науковий співробітник

*Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства
ім. В. Є. Таїрова»*

E-mail: lkmicrobiol@ukr.net

***Анотація.** Були обстежені базові і сертифіковані маточні насадження винограду у господарствах Одеської області. Використано методику ідентифікації вірусних хвороб: вірусу скручування листя винограду (GLRaV 1-3) першого і третього серотипів та коротковузля винограду (GFLV). Рання діагностика цих вірусів винограду методом полімеразної ланцюгової реакції дозволяє швидко визначити якість садивного матеріалу винограду. Виявлено виноградні рослини із симптомами та в латентній формі вірусних хвороб винограду.*

***Ключові слова:** виноград, віруси винограду, полімеразна ланцюгова реакція, ідентифікація*

Найбільш шкодочинними вірусними хворобами винограду є скручування листя (GLRaV) і коротковузля (GFLV), які дуже поширені в усіх виноградарських районах світу і призводять до значних втрат винограду і погіршенню його якості [1, с.1-50; 2, с. 749–753; 3, с. 347–352]. Так, вірус скручування листя винограду викликає зменшення вмісту цукру в ягодах до 16 %, в втрати урожаю складають 10-50 % [4, с. 97-105]. Вірус коротковузля винограду викликає зменшення вмісту цукру в ягодах на 1-3 %, а втрати урожаю складають 12-60 % [5, с. 283–287]. Досить часто вірусні хвороби протікають у прихованій формі, без наявних симптомів захворювання. Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розпізнати кущі з латентною інфекцією і запобігти заготовленню з них лози для вегетативного розмноження

рослин. Раніше діагностику на приховане ураження вірусами скручування листя і коротковузля проводили методами індексації щепленням. Сучасні серологічні і молекулярно-генетичні методи дозволяють з високою точністю ідентифікувати уражені виноградні рослини [6, с. 933–942; 7, с. 17-49].

Мета дослідження – діагностика вірусних хвороб винограду для виробництва сертифікованого садивного матеріалу з використанням новітніх серологічних і молекулярно-біологічних методів діагностики, таких як імуноферментний аналіз (ІФА), метод полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР ПЛР зі зворотною транскрипцією і ПЛР у реальному часі) та вивчення поширення збудників вірусних хвороб на виноградниках України.

Матеріали і методи досліджень. Епідеміологічні дослідження проводили візуально на всій площі ділянки, обраній для дослідження. Обліки симптомів коротковузля на зелених частинах виноградного куща (листя, пагони) проводили у травні – червні, скручування листя – в серпні – вересні.

В процесі візуального виявлення симптомів вірусних хвороб орієнтувались на:

- морфологічну зміну листя і пагонів хворих кущів у порівнянні зі здоровими.
- зміну забарвлення листя (почервоніння або пожовтіння тканин між жилками) з одночасним помірним або сильним скручуванням країв листків донизу за ураження скручуванням листя.

Матеріалом для дослідження слугували листя, жилки, верхівки молодих пагонів, камбіальні зіскребки з дерев'яної лози.

Для діагностики та ідентифікації вірусу скручування листя винограду 1 і 3 серотипів використовували пари праймерів – відповідно С 547 і Н 229, CPV і CPC, що дозволяють відрізнити GLRaV-3 і GLRaV-1 від інших серотипів GLRaV [8, с. 148].

В процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температура відпалу була змінена. Синтезований за цих температур фрагмент ДНК відповідав довжині амплікону для даної пари праймерів (340

п.о. – для GLRaV-3 і 430 п.о. для GLRaV-1), крім того, спостерігалася менша кількість неспецифічних продуктів реакції [10, с. 222-226].

Для діагностики вірусу коротковузля використовували пари праймерів oligoC1 і oligoV1 [11, с. 933-942].

Розроблена методологія і методи ДНК-ідентифікації вірусної інфекції за допомогою ПЛР із зворотною транскрипцією та мультиплексною ПЛР у реальному часі.

Тотальну РНК екстрагували з 0,1 г свіжої листової тканини, подрібненої в рідкому азоті, методом фенольно-хлороформної депротеїнізації з додецилсульфату натрію. ЗТ-ПЛР виконували за методикою Wetzel et al. (1991). Для детекції GFRaV 1 використовували пару праймерів CPV/CPC. Для детекції GFRaV 3 – C547/H229 («Синтол», Росія), а також зворотну транскриптазу AMV («Promega») і Taq-ДНК-полімеразу («Invitrogen»). В якості позитивного контролю ПЛР використовували рекомбінантну плазмиду pGEM3-PPVNAT65 (надану E. Maiss, Univ. Hannover, Німеччина). З метою покращення результатів ЗТ-ПЛР були випробувані наступні $T_{від}$ праймерів CPV/CPC: 50 °C, 54 °C, 58 °C, 60 °C [8, с. 148].

Застосування $T_{від}$ 54 °C для діагностики GFRaV 1 дозволило отримати одиничний продукт специфічної ампліфікації. В оптимізації концентрації іонів Mg^{++} у реакційній суміші не було потреби.

Під час використання мультиплексною ПЛР у пробірку вносили кілька видів праймерів (CPV/CPC, C547/H229 та oligoC1/oligoV1) до різних вірусів. Праймери, що в мультиплексній ЗТ-ПЛР, мали наступну особливість: в той час як їх 3'-кінцева половина комплементарна фрагментам цільових мішеней, 5'-кінцевих ділянок всього два види: перший з них – однаковий для всіх прямих праймерів, а другий однаковий для всіх зворотних. На основі нуклеотидних послідовностей генів було підібрано праймери і зонди, мічені флуоресцентними мітками -FAM, JOE, які дозволяють проводити детекцію флуоресценції у режимі реального часу. З використанням підібраних праймерів і зондів було сформовано реакційну суміш для мультиплексною ПЛР-РЧ [9, с. 235-244].

Оскільки віруси скручування листя і коротковузля винограду є РНК-вмісними, то для їх виявлення необхідно проведення стадії зворотної транскрипції (ОТ). В якості праймерів для проведення мультиплексної реакції зворотної транскрипції використовували олігонуклеотиди, комплементарні фрагменту вірусного генома, що представляють собою частину відповідного праймера для ПЛР-РВ. У пробірки із праймерами додавали по 2 мкл РНК, виділеної з досліджуваних зразків ПКО і прогрівали протягом 5 хв за 65 °С, потім охолоджували до кімнатної температури протягом 3 хв. Пробірки зі зразками центрифугували з метою осадження конденсату. Далі доводили об'єм реакційної суміші до 25 мкл заздалегідь приготовленою сумішшю для ЗТ, що містила реакційну суміш для проведення ПЛР у реальному часі, 30 од. ревертази. Для інактивації ферменту суміш прогрівали за 95 °С протягом 5 хв. Далі зразки центрифугували з метою осадження конденсату, після чого до зразків кДНК додавали реакційну суміш для ПЛР, суміш 3-х наборів праймерів (по 6 пмоль кожного праймеру), 3 зонда (по 5 пмоль кожного зонда), 2,5 од. Таq ДНК полімерази, доводячи об'єм суміші до 50 мкл, після чого проводили реакцію ПЛР-РЧ в термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралія). Кожен досліджуваний зразок аналізувався в реакційних сумішах у присутності контрольних зразків ПКО і НКО. Мультиплексна ампліфікація призводить до одночасної ампліфікації двох і більше послідовностей ДНК в одній реакції ПЛР. Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів робили за допомогою програмного забезпечення до приладу для ПЛР-РЧ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралія), керуючись інструкцією виробника. Позитивним вважається зразок, під час аналізу якого спостерігається зростання флуоресцентного сигналу на одному з колірних каналів ампліфікатора. Метод досить зручний: помістивши пробу в одну пробірку і проаналізувавши результат реакції можна виявити наявність цілого ряду вірусних фітопатогенів [10, с. 222–226]. До переваг даного методу слід віднести зниження витрат на реактиви для ПЛР та електрофорезу, зниження трудовитрат на постановку

реакції, зменшення завантаження устаткування і збільшення швидкості постановки діагнозу.

Результати досліджень та їх обговорення. Розроблено і оптимізовано метод ЗТ-ПЛР для санітарного контролю рослин базових і сертифікованих маточників на площі 50 га вибірково.

В ході дослідження був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області.

Під час обстеження насаджень у зоні промислового виноградарства на території Миколаївської і Херсонської областей було виявлено на окремих кущах симптоми вірусних хвороб –скручування листя винограду, які проявлялися у відставанні росту кущів, хлорозі, скручуванні листя, усиханні ягід на гронах, зменшенні цукристості і збільшення кислотності ягід.

В процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температура відпалу була змінена. Синтезований за цих температур фрагмент ДНК відповідав довжині амплікону для даної пари праймерів (340 п.о. – для GLRaV-3 і 430 п.о. для GLRaV-1), крім того, спостерігалася менша кількість неспецифічних продуктів реакції.

За період 2015 року були проведені скринінгові дослідження 270 зразків клонового і рядового матеріалу винограду різних сортів на виявлення вірусу коротковузля (GFLV) і вірусів скручування 1-го та 3-го серотипів (GLRaV1-3). Зразки відбирали на виноградниках півдня України на площі понад 150 га насаджень.

Для тестування кущів клонів винограду на наявність вірусу коротковузля винограду в серпні – вересні відбирали верхнє листя рослин, вірусу скручування – нижнє листя винограду, а також виділення вірусів винограду проводили у здерев'янілих пагонах. Для діагностики та ідентифікації вірусу скручування листя винограду 1 і 3 серотипів використовували пари праймерів відповідно С 547 і Н 229, CPV і CPC, що дозволяють відрізнити GLRaV-3 і GLRaV-1 від інших серотипів GLRaV.

Для ідентифікації вірусу скручування винограду ми використали ПЛР-аналіз. За допомогою ПЛР-методу було проведено перевірку великої кількості зразків на латентне ураження зразків винограду вірусами GLRaV-1 і GLRaV-3.

За допомогою цього методу була проведена перевірка значної частини матеріалу перспективних клонів, які були рекомендовані для подальшого розмноження, на латентне ураження вірусом скручування листя винограду. Всі тестовані кущі виявилися вільними від вірусу скручування листя винограду.

Ступінь візуального ураження скручуванням листя обстежених промислових виноградників складає від 1,1 % до 6,5 % від загальної кількості рослин на ділянках.

В результаті проведення ЗТ-ПЛР аналізу отримано дані з розповсюдження латентної форми вірусних хвороб винограду, а саме вірусу коротковузля і вірусу скручування листя 1-го і 3-го серотипів.

Оптимізована мультиплексна кількісна реал-тайм ПЛР для одночасної детекції різних вірусів винограду є кращою альтернативою традиційної ПЛР, тому результати доступні протягом 4-5 год у високо стандартизованому форматі без обробки ПЛР продуктів, що знижує ризик хибнопозитивних результатів, які можуть мати місце під час маніпуляцій з ампліконами. Дана методика дає можливість детективувати кілька патогенів одночасно, що надзвичайно економічно для зразків малої кількості. Інша перевага технології полягає в можливості кількісного обліку ампліфікованих продуктів.

Розроблена технологія дозволяє диференційно виявити в досліджуваних зразках різних вірусів винограду. Наявність у досліджуваній пробі нуклеїнових кислот вірусу визначається зростанням сигналу флуоресценції певного барвника в одній з реакційних сумішей.

Праймери і зонди були синтезовані в компанії Сінтол (Росія).

З використанням підібраних праймерів і зондів було сформовано реакційну суміш для мультиплексної ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ). Оскільки віруси скручування листя і коротковузля винограду є РНК-вмісними, то для їх виявлення необхідно проведення стадії зворотної транскрипції (ОТ). В якості

праймерів для проведення мультиплексного реакції зворотної транскрипції використовували олігонуклеотиди, комплементарні фрагменту вірусного генома, що представляють собою частину відповідного праймера для ПЛР-РЧ. У пробірки із праймерами додавали по 2 мкл РНК, виділеної з досліджуваних зразків ПКО і прогрівали протягом 5 хв за 65 °С, потім охолоджували до кімнатної температури протягом 3 хв. Пробірки зі зразками центрифугували з метою осадження конденсату. Далі доводили об'єм реакційної суміші до 25 мкл заздалегідь приготовленою сумішшю для ЗТ, що містила реакційну суміш для проведення ПЛР-РЧ, 30 од. ревертази. Для інактивації ферменту суміш прогрівали за температури 95 °С протягом 5 хв. Далі зразки центрифугували з метою осадження конденсату, після чого до зразків кДНК додавали реакційну суміш для ПЛР-РЧ, суміш 3-х наборів праймерів (по 6 пмоль кожного праймеру), 3 зонда (по 5 пмоль кожного зонда), 2,5 од. Таq ДНК полімерази, доводячи об'єм суміші до 50 мкл, після чого проводили реакцію ПЛР-РЧ в термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралія). Кожен досліджуваний зразок аналізувався в реакційних сумішах у присутності контрольних зразків ПКО і НКО.

Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів робили за допомогою програмного забезпечення до приладу для ПЛР-РЧ Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралія), керуючись інструкцією виробника. Позитивним вважається зразок, під час аналізу якого спостерігається зростання флуоресцентного сигналу на одному з колірних каналів ампліфікатора. Діагностика вірусу коротковузля методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу забезпечує отримання найбільш якісних і точних результатів ПЛР-аналізу, замінює детекцію продуктів ПЛР методом електрофорезу (рис. 1).

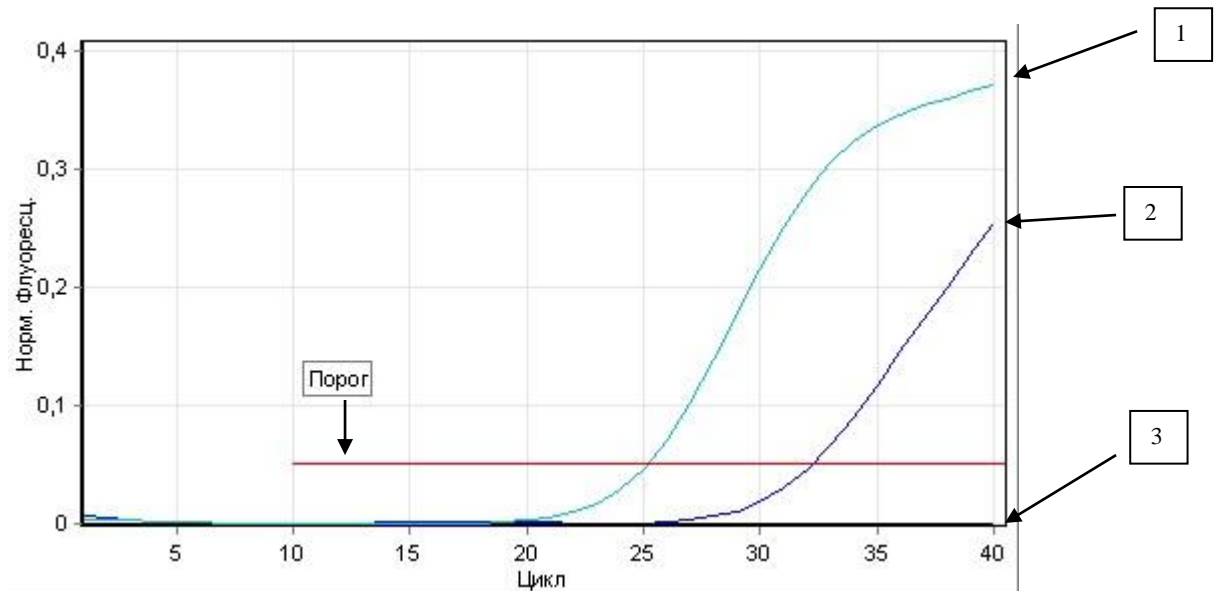


Рис. 1. Детекція вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу: 1- зразок, заражений вірусом коротковузля; 2 - позитивний контроль, 3 – негативний контроль

Водночас немає сенсу відкривати і діставати продукти ампліфікації, що зводить до мінімуму ризик контамінації лабораторії продуктами ПЛР. Автоматичний облік результатів дозволяє виключити суб'єктивні помилки під час інтерпретації отриманих даних.

Попередні результати апробації методики ЗТ-ПЛР-RT вірусу коротковузля свідчить про її високу аналітичну чутливість і специфічність.

Метод рекомендовано до впровадження у систему санітарного контролю за виробництва сертифікованого садивного матеріалу в розсадниках України.

Висновки та перспективи

1. Проведено дослідження наявності вірусних хвороб серед сортів клонів винограду.
2. Встановлено, що найбільш розповсюдженими вірусами винограду є вірус скручування листа 1-го і 3-го серотипів і вірус коротковузля винограду.
3. Розроблено мультиплексну реал-тайм ПЛР для детекції вірусів винограду, що є найкращою альтернативою традиційній ЗТ-ПЛР для діагностики, оскільки результати доступні в продовж 4-5 год у високо стандартизованому форматі без обробки ПЛР продуктів, що знижує ризик хибних результатів, які можуть мати місце під час маніпуляцій з ампліконами.

4. Розроблена методика дає можливість детектувати декілька патогенів одночасно, що є дуже економічним для зразків у малій кількості, а також дає можливість кількісного звіту ампліфікованого продукту.

5. Вперше розроблена методика виявлення вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР із детекцією флуоресценції в режимі реального часу.

Список літератури

1. Вердеревская, Т. Д., Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т. Д. Вердеревская, В. Г. Маринеску. – Кишинев: Штинца, 1985. – 236 с.

2. Rowhani, A. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue / A. Rowhani, C. Chay, D. A. Golino, B. W. Falk // *Phytopathology*. - 1993. – Vol. 83, Issue 7 – P. 749-753.

3. Rowhani, A. Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions / A. Rowhani, M. A. Mamingas, L. S. Lile // *Phytopathology*. - 1995. – Vol. 85, Issue 3 – P. 347-352.

4. Boscia, D. Identification of the agent of grapevine fleck disease / D. Boscia, G. P. Martelli, V. Savino, M. A. Castellano // *Vitis*. – 1991. – Vol. 30, Issue 5 – P. 97-105.

5. Minafra, A. Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine / A. Minafra, F. Grieco, D. Gallitelli, G. P. Martelli // *Bulletin OEPP/EPPO*. - 1995. - Issue 25 – P. 283-287.

6. Martelli, G. P. Nature and physiological effects of grape vine diseases / G. P. Martelli, A. Graniti, G. L. Ercolani // *Experientia*. – 1986. – Issue 42 – P. 933-942.

7. Bovey, R. Maladies a virus et affections similaires de la vigne / R. Bovey, W. B. Hewitt, G. P. Martelli. – Stuttgart: Payot, La Maison Rustique, 1980. – 153 p.

8. Rowhani, A. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses: proc. 13th ICVG conf. / A. Rowhani, L. Biardi, R. Johnson // *Applied Informatics*. – Adelaide (Australia)/ 2000. – P. 148.

9. Fattouch, S. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of Grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines / S. Fattouch, S. M'Hirsi, H. Acheche, M. Marrakchi, N. Marzouki // *Plant Mol. Biol. Rep.* –2001. – Issue 19 – P. 235-244.

10. MacKenzie, D.J. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription - polymerase chain reaction / D. J. MacKenzie, M. A. McLean, S. Mukerji, M. Green // *Plant disease*. - 1997. - Vol. 81, Issue 2 - P. 222–226.

11. Martelli, G. P. Nature and physiological effects of grape vine diseases / G. P. Martelli, A. Graniti, G. L. Ercolani // *Experientia*.- 1986. - Issue 42 - P. 933–942.

References

1. Verderevskaya, T. D., Marynesku V. H. (1985), *Virusnie i mykoplazmennie zabolevaniya plodovikh kul'tur y vynohrada* [Viral and mycoplasma diseases of fruit crops and grapes]. Kyshynev, Moldova: Shtyntsa, 236.
2. Rowhani, A., Chay C., Golino, D. A., Falk, B. W. (1993). Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83(7), 749–753.
3. Rowhani, A., Mamingas, M. A., Lile, L. S. (1995). Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85(3), 347–352.
4. Boscia, D., Martelli, G. P., Savino, V., Castellano M. A. (1991). Identification of the agent of grapevine fleck disease. *Vitis*, 30(5), 97–105.
5. Minafra, A., Grieco, F., Gallitelli, D, Martelli G. P. (1995). Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine. *Bulletin OEPP/EPPO*, (25), 283–287.
6. Martelli, G. P., Graniti, A., Ercolani, G. L. (1986). Nature and physiological effects of grape vine diseases. *Experientia*, (42), 933–942.
7. Bovey, R., Hewitt, W. B., Martelli, G. P. (1980). *Maladies a virus et affections similaires de la vigne*. Stuttgart, Germany: Payot, La Maison Rustique, 153.
8. Rowhani, A., Biardi, L., Johnson, R. (2000). Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. *Proceeding of 13th international ICVG Conference. Applied Informatics. Adelaide (Australia)*, 148.
9. Fattouch, S., M'Hirsi, S., Acheche, H., Marrakchi, M., Marzouki, N. (2001), RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of Grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines. *Plant Mol. Biol. Rep.*, (19), 235-244.
10. MacKenzie, D. J., McLean, M. A., Mukerji, S., Green, M. (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription - polymerase chain reaction. *Plant disease*, 81(2), 222–226.
11. Martelli, G. P., Graniti, A., Ercolani, G. L. (1986). Nature and physiological effects of grape vine diseases. *Experientia*, (42), 933–942.

ДИАГНОСТИКА ВИРУСОВ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА И КОРОТКОУЗЛИЯ В ПРОЦЕССЕ ПРОИЗВОДСТВА СЕРТИФИЦИРОВАННОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА

А. И. Конуп, Л. А. Конуп, В. Л. Чистякова

Аннотация. Были обследованы базовые и сертифицированные маточные насаждения винограда в виноградарских хозяйствах Одесской области.

Применяли методику идентификации вирусных болезней: вируса скручивания листьев винограда (GLRaV 1-3) первого и третьего серотипов и вируса короткоузлие винограда (GFLV). Ранняя диагностика этих вирусов методом полимеразной цепной реакции позволяет быстро определить качество посадочного материала винограда. Выявлены виноградные растения с симптомами и в латентной форме вирусных болезней винограда.

Ключевые слова: *виноград, вирусы винограда, полимеразная цепная реакция, идентификация*

DIAGNOSTICS OF VIRUSES OF GRAPE LEAFROLL AND VINE FANLEAF IN THE PROCESS OF PRODUCTION OF CERTIFIED SPROUT OF GRAPES

A. Konup, L. Konup, V. Chistyakova

Abstract. *Basic and certified mother liquor grape plantations were examined in the Odessa region. The procedure of identification of viral diseases: VIRUS of GRAPE LEAFROLL of the first - third serotypes (GLRaV 1-3) and virus of vine FANLEAF (GFLV). The method of polymerase chain reaction allows operatively assess the quality of planting material. Plants were identified with symptoms of viral diseases, as well as having in their latent form.*

Key words: *grape, vine virus, polymerase chain reaction, identification*