

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСНИХ, БАКТЕРІАЛЬНИХ І ФІТОПЛАЗМОВИХ ХВОРОБ ВИНОГРАДУ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ

А. Конуп, В. Чистякова, Л. Конуп*

Національний науковий центр
«Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова»
вул. 40-річчя Перемоги, 27, Одеса 65496, Україна
e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

Об'єктом досліджень лабораторії вірусології та мікробіології ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» були збудники вірусних, фітоплазмових хвороб винограду, а також збудник бактеріального раку винограду (*Rhizobium vitis*). Мета дослідження полягала у виявленні, діагностиці, ідентифікації цих хвороб на промислових виноградниках півдня України. Для діагностики на латентне ураження хворобами відпрацьовано й оптимізовано метод ПЛР-діагностики. Пара праймерів на основі *ipt* генів дала змогу виявити *Rhizobium vitis* у різних органах винограду. Дослідження рослин сорту Шардоне встановила наявність латентної фітоплазмової інфекції у зразках як вітчизняного, так і імпортного виробництва. Встановлено, що латентно ураженими вірусами винограду є садивний матеріал виробництва Молдова і Словенія.

Ключові слова: вірусні хвороби винограду, фітоплазми, бактеріальний рак, почорніння деревини винограду, ПЛР.

Rhizobium vitis біовар 3, згідно з новою номенклатурою [21] є збудником бактеріального раку винограду – захворювання, яке призводить до значних втрат як на молодих насадженнях, так і на виноградниках, що плодоносять. Бактеріальний рак – системне захворювання; збудник розповсюджується по судинній системі рослини, виділяється зі здерев'янілих пагонів і коріння [15]. Інфікована рослина може не проявляти симптомів захворювання і при вегетативному розмноженні бути джерелом розповсюдження *Rhizobium vitis* на значній території [8].

Джерелом інфекції у ґрунті є коріння, яке залишається після видалення інфікованих кущів, а також самі хворі рослини [9, 17]. З інфікованого ґрунту патоген може проникати у здорову рослину [10]. Факторами, що сприяють розвитку бактеріального раку на винограднику, є вологість, холодні зими [8]. Це ранева інфекція, і збудник потрапляє у рослинні тканини крізь пошкоджені ділянки [15].

Вірусні, бактеріальні та фітоплазмові хвороби винограду призводять до значних збитків у всіх регіонах з розвинутим виноградарством [1, 2, 17]. Візуальне обстеження виноградників – один із шляхів обмеження поширення вірусів, фітоплазм і *Rhizobium vitis* – збудника бактеріального раку винограду. На даний час добре відома епідеміологія та поширення найшкідливіших вірусів, фітоплазм і *Rhizobium vitis* [1, 3]. Відомо, що виноградарство світу щороку втрачає приблизно 10% врожаю від ураження вірусними хворобами, 15% від ураження збудником бактеріального раку винограду і 45% – від ураження фітоплазмовою інфекцією [3, 4, 8].

Згідно з визначенням стандарту Європейської та Середземноморської організації з карантину й захисту рослин (ЕРРО), наводиться перелік хвороб винограду, яких не має

бути у садивному матеріалі винограду [12, 13]. У Європейському Економічному Співтоваристві кущі клонів винограду перевіряють на віруси: коротковузля (*GFLV*), скручування листя (*GLRaV 1-7*), мармуровість (*GFKV*), борознистість деревини Рупестріс, ямчастості деревини Кобера і відсутність афінитету, ямчастості деревини ЛН-33. У 2008 р. на сортах рослин Піно чорне і Каберне Совіньйон на території Одеської обл. нами виявлена фітоплазмова інфекція – почорніння деревини, яка була ідентифікована за допомогою ПЛР [5].

Фітоплазми – мікоплазмоподібні організми, прокаріоти – належать до класу *Mollicutes*, рід *Mycoplasma*. В основі філогенетичної системи лежить критерій спорідненості первинної структури 16S рибосомальної РНК, розповсюдженій в усіх країнах Європи та Малій Азії [7]. Встановлено, що деякі представники класу *Mollicutes* є збудниками більше 600 захворювань рослин [7]. За шкідливістю мікоплазмені інфекції рослин належать до катастрофічних захворювань, які часто набувають характеру епіфітотій. Симптоми прояву фітоплазмової хвороби винограду полягають у скручуванні листя, знебарвлюванні жилок і листової пластинки, слабкому визріванні виноградної лози, опаданні квіточок або зів'яненні ягід. Переносником збудника почорніння деревини на виноградниках і на різнотрав'ї встановлена цикада *Hyaletthes obsoletus* [6].

Візуальний фітосанітарний контроль не дає змогу виявити кущі з латентною інфекцією та запобігти заготовленню з них лози для вегетативного розмноження рослин. Багато років діагностика вірусів базувалася на щепленні на сорти-індикатори. Однак цей метод потребує кількох років дослідження. Метод полімеразної ланцюгової реакції дає змогу у стислі строки визначити наявність пухлиноутворюючих бактерій у лозі, корінні винограду, ґрунті, інфікованість кущів винограду фітопатогенними вірусами [15].

Метою даної роботи було виявлення та ідентифікація збудників вірусних, фітоплазмових хвороб і збудника бактеріального раку винограду на промислових виноградниках півдня України.

Матеріали та методи

На ураженість пухлиноутворюючими агробактеріями упродовж 2014 р. досліджували клони підщепних сортів *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5 ББ, *V. berlandieri* x *V. riparia* СО₄ і *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 та клони прищепних сортів Каберне Совіньйон, Ріслінг рейнський, Мерло рожеве та Шардоне.

Тестування на латентне ураження збудником бактеріального раку винограду *Rhizobium vitis*, а також наявність збудника у різних ґрунтах проводили за допомогою ПЛР. Для ампліфікації фрагмента Ті-плазміді використовували *ipt* і *VirD2* праймери. Виділення збудника бактеріального раку зі здерев'янілої лози винограду проводили згідно з методом Лехоцьки [18] з висівом на напівселективне поживне середовище Рой і Сасера (RSM) [22]. Після інкубації упродовж 5–7 днів при 25°C колонії пересівали на скошений картопляний агар. ПЛР проводили з ДНК, виділеними з ододобових культур шляхом теплового лізису бактеріальної суспензії [7, 10]. Об'єм реакційної суміші для проведення ПЛР становив 20 мкл, об'єм зразка – 5 мкл. У реакційну суміш вносили по 10 pmol кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 U Taq – полімерази, 2 mM MgSO₄, 4 мкл буферу для проведення ПЛР (5x). Усі реагенти виготовлені фірмою „Fermentas” (Литва).

Ампліфікацію проводили згідно з параметрами Naas et al. [16], збільшивши температуру відпалу до 52°C, а час початкової денатурації – до 3-х хв.

Для тестування винограду на віруси використовували імуноферментний аналіз із діагностичними наборами фірми “Agritest” (Італія), до складу яких входили як позитивні, так і негативні контролю. Тестування проводили згідно з розробленою нами методикою МВВ-001-00412056-2003 «Методика лабораторної діагностики вірусних та бактеріальних

інфекцій винограду методом ІФА» та ПЛР-аналіз із різними парами праймерів: для детекції GLRaV 1- CPV/CPC; GLRaV-3 – C547/H229; GVA – C995/H587; GVB – C547/H229; RSPaV -13/14; GFLV – oligoC1/oligo V1; GFkV – RD1/RD2 («АмпліСенс», Росія) [14].

Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції та полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) об'ємом 25 мкл містила дейонізовану воду, 10X ПЛР буферу (500 м KCl, 100 м Tris-HCl, pH 9,0), сахарозу (20%) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дитіотриетолу (ДТТ), 10 pmol кожного праймера, 1,25 U Taq-полімерази („Fermentas”, Литва), 8 U ревертази («Fermentas», Литва), 1,5 мМ MgSO₄ (для GLRaV-1 та GLRaV-3), 1,3 мМ MgSO₄ (для GFLV). У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка [19, 20].

Зворотну транскрипцію проводили у термостаті при 52°C протягом 30 хв. Ампліфікація включала 35 циклів (94°C – 30 с, 56°C – 45 с, 72°C – 60 с), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хв (Rowhani A., особисте повідомлення). Для GLRaV-1 температура відпалу була зменшена до 53°C, а для GFLV збільшена до 61°C.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті „Терцик” фірми „ДНК-Технологія” (Росія). Електрофорез проводили в 1,5% агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трисборатного буферу для електрофорезу («Fermentas», Литва). Гель фотографували за допомогою відеосистеми „Samsung” під УФ-випромінюванням (довжина хвилі 312 нм). Для встановлення молекулярної маси ампліфікованих фрагментів використовували маркер 800–100 пар основ («Fermentas», Литва).

ПЛР ампліфікацію проводили з універсальною парою праймерів до різних ділянок геному, специфічною для фітоплазм fU5/rU3 [особисте повідомлення Faggioli, 11]. Праймери синтезовані фірмою НПФ «Литех», Росія.

Результати і їхнє обговорення

Бактеріальний рак виявлений нами на багатьох сортах винограду, особливо на тих, котрі у минулому завезені в Україну з-за кордону.

У ході дослідження нами було встановлено відсоток кущів із латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської обл. Усього було протестовано 104 кущі клонів винограду. Сорти *V. berlandieri* x *V. riparia* CO₄, *V. riparia* x *V. rupestris* 101 – 14 виявилися не інфікованими *Rhizobium vitis*, тоді як *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5 ББ в 5,8% був уражений бактеріальним раком (табл. 1).

Таблиця 1

Зараженість підщепних і прищепних сортів винограду збудником бактеріального раку винограду *Rhizobium vitis*

Сорт	Країна-постачальник	Відсоток інфікованих кущів, %
<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> CO ₄	Україна	0
<i>V. riparia</i> x <i>V. rupestris</i> 101 – 14	Франція	0
<i>V. berlandieri</i> x <i>V. riparia</i> Кобера 5 ББ	Франція	5,8
Каберне Совінйон	Франція	4,5
Мерло рожеве	Австрія	3,9
Рислінг рейнський	Україна	1,5
Шардоне	Україна	0,8
Шардоне	Франція	9,2

Серед підщепних сортів ураженим збудником бактеріального раку виявився *V. berlandieri* x *V. riparia* Кобера 5 ББ, серед прищепних сортів – Каберне Совінйон і Мерло рожеве (табл. 1).

У результаті проведених досліджень методами ІФА і ПЛР встановлено, що латентно ураженим вірусами скручування листя і коротковузля є садивний матеріал виробництва Молдова та Словенія (табл.2, 3) й ідентифіковано почорніння деревини у рослинах сорту Шардоне виробництва Франція, Німеччина та Італія (табл. 4).

Таблиця 2

Виявлення вірусу скручування листя винограду *GLRaV 1-3* в саджанцях винограду

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	0,7	0,3	–	–
Шардоне	0,25	–	–	–

Під час тестування садивного матеріалу сорту Каберне Совіньйон виявлено, що латентно інфікованими вірусом скручування листя були саджанці виробництва Молдова та Словенія. Сорт Шардоне виробництва Молдова.

Таблиця 3

Виявлення вірусу коротковузля винограду *GFLV* в саджанцях винограду

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	0,45	–	0,1	–
Шардоне	0,5	–	–	–

Тестування саджанців сортів Каберне Совіньйон і Шардоне показало, що латентно ураженими вірусом коротковузля виявилися саджанці виробництва Молдова і Німеччина.

Таблиця 4

Виявлення почорніння деревини винограду в саджанцях винограду

Сорт	Країна-імпортер			
	Італія	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	–	–	–	–
Шардоне	7,1	–	10,16	20,0

У 2014 р. на сорті Каберне Совіньйон виявлено захворювання, пов'язане з загибеллю кущів. Причому кількість хворих кущів становила від 0,2 до 4%. На поперечних зрізах штамбу і рукавів рослин, які гинули, було видно клиноподібні плями і слизоподібні виділення.

Детекція сорту Шардоне за допомогою ПЛР-аналізу встановила наявність латентної фітоплазмової інфекції в деяких зразках вітчизняного виробництва (див. рисунок).

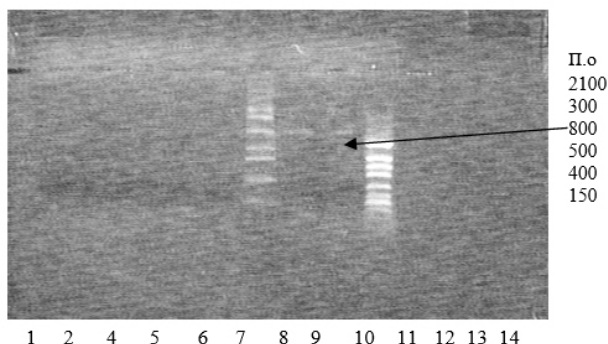
Таким чином, використовуючи сучасні методи діагностики, можна запобігти завезенню ураженого садивного матеріалу і його розповсюдженню.

Подальші дослідження у даному напрямі допоможуть зробити висновки про поширеність бактеріального раку, скручування листя, коротковузля та фітоплазмової інфекції на виноградниках і розробити заходи захисту винограду від цих шкочинних хвороб.

Використання сучасних методів діагностики, а саме методу ПЛР дає змогу в короткий строк виявити й ідентифікувати вірусні хвороби винограду і завдяки цьому запобігти їх розповсюдженню.

Встановлено, що найбільш ураженими латентною формою вірусів скручування листя і коротковузля винограду є садивний матеріал виробництва Молдова.

Встановлено, що одним із джерел розповсюдження фітоплазмової інфекції в Україні є імпортований садивний матеріал. Інфікованість виноградних саджанців сорту Шардоне, які були інтродуковані з Франції, Італії та Німеччини, становила: 20,0; 7,1; 10,16% відповідно.



Електрофорез продуктів ампліфікації збудника почорніння деревини зразків сорту Шардоне в агарозному гелі: 1–6, 8, 9, 11, 12 – зразки, проампліфіковані з універсальною парою праймерів fU5/rU3; 1–6, 11, 12 – зразки, не інфіковані фітоплазмою; 8, 9 – зразки, уражені фітоплазмою винограду; 7, 10 – маркер молекулярної маси (2100-150 п.о., фірма „Fermentas”, Литва).

На виноградниках і на різнотрав'ї уздовж них виявлена цикада *Hyalesthes obsoletus*, відома як переносник збудника почорніння деревини. Рекомендації зі знищення бур'янів – резерваторів фітоплазми – дали змогу запобігти поширенню захворювання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Вердеревская Т. Д., Маринеску В. Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинёв: Штиинца, 1985. С. 212–242.
2. Гнутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука, 1985. С. 137–147.
3. Леманова Н. Б., Гатина Э. Ш. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур. Кишинев: Штиинца, 1991. С. 27.
4. Маленин И. Устойчивость некоторых европейских сортов и подвоев к бактериальному раку // Лозарство и винарство. 1981. № 1. С. 32.
5. Чистякова В. Л., Щербина А. В., Конуп Л. О., Конуп А. І. Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб на столових сортах винограду // Інноваційні технології в розвитку столового виноградарства: матеріали Міжнар. наук-практ. конф. молодих учених і спеціалістів (30 серпня 2011 р., м. Одеса). С. 109–112.
6. Alma A., Soldi G., Tedeschi R., Marzachi C. Ruolo di *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Homoptera Cixiidae) nella trasmissione del Legno nero della vite in Italia // Atti II Incontro Nazionale sulle Malattie da Fitoplasmi (3–4 ottobre 2002, Roma). 2002. P. 57–58.
7. Burr T. J., Bazzi C., Süle S., Otten L. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies // Plant Dis. 1998. N 82. P. 1288–1297.
8. Burr T. J., Katz B. H. Grapevine cuttings as potential sites of survival and means of dissemination of *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Dis. 1984. Vol. 68. P. 976–978.
9. Burr T. J., Katz B. H. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil // Phytopathol. 1983. Vol. 73. P. 163–165.
10. Burr T. J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. 1999. N 37. P. 53–80.
11. Boudon-Padieu E. The situation of grapevine yellows and current research directions: distribution, diversity, vectors, diffusion and control // 14th ICVG Conf., Locorotondo, Italy, 12–17 Sept. 2003. P. 47–53.

12. Clark M. F., Bar-Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology // *Methods in Virology*. 1984. N 7. P. 51–85.
13. EPPO Standards. Certification schemes. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks // European and Mediterranean Plant Protection Organization. Paris, France, 2003. – PM 4/1-26 English. P. 1–13.
14. Esmenjaud D., Abad P. Detection of a region of the coat protein gene of grapevine fanleaf virus by RT-PCR in the nematode *Xiphinema index* // *Plant Disease*. 1994. Vol. 78. N 11. P. 1087–1090.
15. Ferreira J. H. S., Zyl F. G. H. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 1997. N 7. P. 101–104.
16. Haas J. H., Moore L. W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // *Appl. Environm. Microbiol.* 1995. Vol. 61. N 8. P. 2879–2884.
17. Krimi Z., Petit A., Mougel P. et al. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium spp.* in soils // *Appl. Environm. Microbiol.* 2002. Vol. 68. N 7. P. 3358–3365.
18. Lehoczky J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines // *Vitis*. 1971. Vol. 10. P. 215–221.
19. MacKenzie D. J., McLean M. A., Mukerji S., Green M. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription – polymerase chain reaction // *Plant Disease*. 1997. Vol. 81. N 2. P. 222–226.
20. Martelli G. P., Graniti A., Ercolani G. L. Nature and physiological effects of grape vine diseases // *Experientia*. 1986. N 42. P. 933–942.
21. Ophel K., Kerr A. *Agrobacterium vitis*, new species for strains of *Agrobacterium* biovar 3 from grapevines // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990. Vol. 40. P. 236–241.
22. Roy M. A., Sasser M. A. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3 // *Phytopath.* 1983. Vol. 73. P. 810.

Стаття: надійшла до редакції 31.03.15

доопрацьована 15.09.15

прийнята до друку 30.10.15

DETECTION VIRAL, BACTERIAL AND PHYTOPLASMA'S DISEASE OF GRAPES IN SOUTH UKRAINE

A. Konup, V. Chistyakov, L. Konup

National Science Center

«Institute of Viticulture and Winemaking named after V. E. Tairov»

27, 40th Anniversary of the Victory St., Odessa 65496, Ukraine

e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

The object of research laboratory of virology and microbiology NSC “IVW n.a. V. Tairov” were viral pathogens, phytoplasma diseases of grapes, as well as the causative agent crown gall of grapes. The aim of the study was to identify, diagnose these diseases in industrial vineyards south of Ukraine. For the diagnosis of latent infection to disease developed and optimized PCR diagnostics. The study of plant Chardonnay has established the existence of latent infection of phytoplasma in samples as Ukrainian and foreign

production. It was found that the latent virus in a grape planting material production is Moldova and Slovenia.

Keywords: viruses diseases of grape, phytoplasma, crown gall disease, *Bois noir*, PLR.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСНЫХ, БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ФИТОПЛАЗМЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ВИНОГРАДА НА ЮГЕ УКРАИНЫ

А. Конуп, В. Чистякова, Л. Конуп

*Национальный научный центр
«Институт виноградарства и виноделия имени В.Е. Таирова»
ул. 40-летия Победы, 27, Одесса 65496, Украина
e-mail: lkmicrobiol@ukr.net*

Объектом исследований лаборатории вирусологии и микробиологии ННЦ «ИВиВ им. В.Е. Таирова» были возбудители вирусных, фитоплазменных болезней винограда, а также возбудитель бактериального рака винограда. Цель исследования состояла в выявлении, диагностике, идентификации этих болезней на промышленных виноградниках юга Украины. Для диагностики на латентное заражение болезнями отработан и оптимизирован метод ПЦР-диагностики. Исследование растений сорта Шардоне установило наличие латентной фитоплазменной инфекции в образцах как отечественного, так и импортного производства. Установлено, что латентно пораженным вирусом винограда является посадочный материал производства Молдова и Словения.

Ключевые слова: вирусные болезни винограда, фитоплазмы, бактериальный рак, почернение древесины винограда, ПЦР.