

## ВІРУСНІ ХВОРОБИ ВІНОГРАДУ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ

**А.І. Конуп**, *молодший науковий співробітник*  
Національний науковий центр  
"Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова"

Досліджено сорти винограду на приховане вірусносієство, що дозволило встановити зараженість вірусними захворюваннями через низьку якість садивного матеріалу. Методами імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією виявлено та ідентифіковано в садивному матеріалі винограду віруси коротковузля і скручування листя.

**Вступ.** Вірусні хвороби винограду призводять до значних збитків у регіонах з розвинутим виноградарством, у т. ч. і в Україні [1]. Виноградарство світу кожен рік втрачає приблизно 10% врожаю через ураження вірусними хворобами [4].

Одним із шляхів обмеження поширення вірусів є фітосанітарна селекція. У Європейському Економічному співтоваристві кущі клонів винограду перевіряються на такі віруси: коротковузля (GFLV), скручування листя (GLRaV 1–7), мармуровість (GFkV), борознистість деревини Рупестріс, ямчатості деревини Кобера і відсутність афінітету, ямчатості деревини ЛН-33.

Основним джерелом розповсюдження бактеріального раку винограду є садивний матеріал, який візуально здоровий, але містить латентну форму збудника бактеріального раку. Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє виявити кущі з латентною інфекцією і запобігти заготовленню з них лози для вегета-

тивного розмноження рослин. Багато років діагностика вірусів базувалася на щепленні на сорти-індикатори. Однак цей метод потребує декількох років дослідження.

На даний час існує ряд сучасних швидких методів діагностики вірусних захворювань винограду. Наприклад, метод полімеразної ланцюгової реакції дозволяє у короткі строки визначити інфікованість кущів винограду фітопатогенними вірусами [5, 6, 9, 11]. Для виявлення вірусних інфекцій винограду ефективно застосовується також імуноферментний аналіз, який є високочутливим, специфічним методом діагностики [2, 8].

Метою даної роботи було дослідження деяких сортів винограду на наявність вірусних захворювань.

**Матеріали та методика досліджень.** У період 2010–2012 рр. проводились скринінгові дослідження 440 зразків клонового та рядового матеріалу винограду різних сортів на наявність вірусів коротковузля (GFLV) та мармуровості (GFkV).

Зразки відбирали на виноградниках півдня України. Для досліджень використовували зразки із специфічними симптомами захворювання і без них (рис.1, 2).

Для тестування кущів клонів винограду в серпні-вересні відбирали верхнє листя рослин. З настанням холодів віруси виділяли із здерев'янілих пагонів. Зразки транспортували в лабораторію і досліджували в той же день або зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$  протягом декількох місяців.

Для тестування винограду на віруси використовували імуноферментний аналіз з діагностичними наборами фірми "Agritest" і ПЛР-аналіз з 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.

Реакційна суміш для проведення зворотньої транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила дейонізовану воду, 10X ПЛР буфера (500 м KCl, 100 м Tris-HCl, pH 9,0), сахарозу (20 %) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дітіотриетолу (ДТТ), 10 pmol кожного праймера, 1,25 U Taq-полімерази ("АмпліСенс", Росія), 8 U ревертази ("АмпліСенс", Росія), 1,5 мМ MgSO<sub>4</sub>

(для GLRaV—1 та GLRaV—3), 1,3 мМ MgSO<sub>4</sub> (для GFLV). У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Зворотню транскрипцію проводили у термостаті при  $52^{\circ}\text{C}$  протягом 30 хв. Ампліфікація включала 35 циклів ( $94^{\circ}\text{C}$  — 30 сек,  $56^{\circ}\text{C}$  — 45 сек,  $72^{\circ}\text{C}$  — 60 сек), а час елонгації в останньому циклі сягав 7 хв (Rowhani A., особисте повідомлення). Для GLRaV—1 температуру відпалу було зменшено до  $53^{\circ}\text{C}$ , а для GFLV — збільшено до  $61^{\circ}\text{C}$ .

Реакцію здійснювали у програмувальному термостаті "Терцик" фірми "ДНК - Технологія" (Росія). Електрофорез проводили в 1,5 % агарозному гелі. Бромистий етідій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трисборатного буфера для електрофорезу ("АмпліСенс", Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми "Samsung" під УФ-випромінюванням (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер 800—1000 пар основ ("АмпліСенс", Росія). Вірус коротковузля і скручування листя винограду винограду діагностували методом ЗТ-ПЛР-Rt у реальному часі. Використовували праймери oligoC1/oligoV1 для вірусу коротковузля і CPV/CPC - для скручування листя 1-го серотипу. На



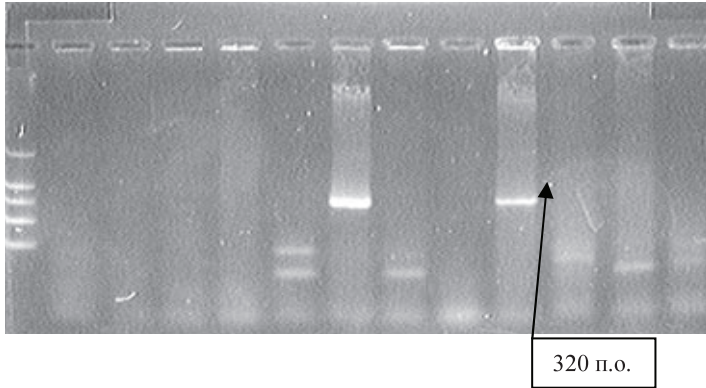
а



б

**Рис. 1.** Морфологічні зміни листків винограду, зараженого вірусом коротковузля (сорт Одеський сувенір) (а); симптоми скручування листя винограду (сорт Каберне Совіньон) (б)

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



**Рис. 2. Електрофорез продуктів реакції в агарозному гелі:** 6 - зразки, інфіковані вірусом коротковузля винограду, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12 - зразки, що не містять вірусу коротковузля; 1 - негативний контрольний зразок; 9 - позитивний контрольний зразок, уражений вірусом коротковузля; М - маркер молекулярної маси (200 - 800 пар основ)

основі нуклеотидних послідовностей генів було підібрано праймери і зонди, мічені флуоресцентними мітками FAM, JOE, які дозволяють проводити детекцію флуоресценції у режимі реального часу. Ампліфікацію здійснювали згідно з рекомендаціями [9] у термоциклері Rotor Gene 6000 (Corbett, Австралія).

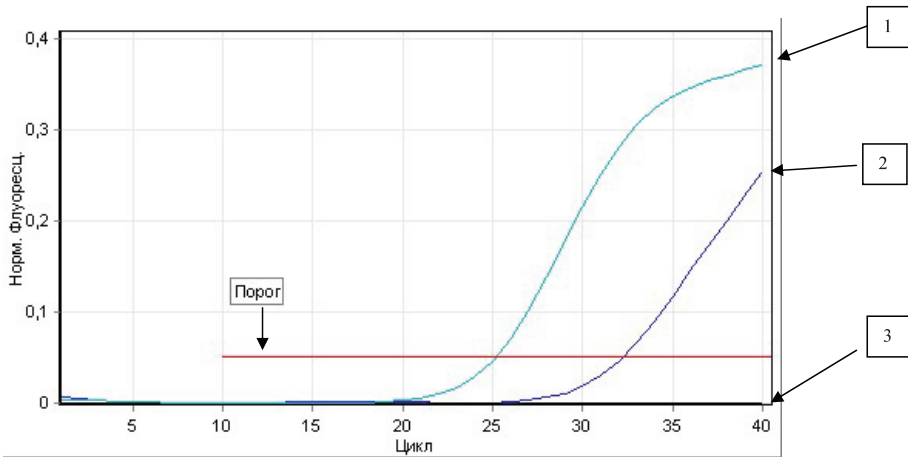
**Результати досліджень.** Сорти Каберне Совіньон, Рислінг рейнський, Мерло рожеве, Одеський чорний та Шардоне досліджували на ураженість ві-

русам виноградів. Виявилося, що куші Рислінг рейнський, Мерло рожеве та Шардоне не містили збудників вірусних хвороб винограду. Сорт Каберне Совіньон був уражений вірусом скручування листя першого серотипу, сорт Одеський чорний – вірусом коротковузля в різній ступені відсоткового співвідношення.

Під час електрофоретичного розділення ідентифіковано РНК-фрагмент розміром близько 320 пар нуклеотидних залишків (п.о.) (рис. 2).

**Таблиця 1. Виявлення кущів винограду з симптомами коротковузля винограду в Одеській області**

Зона обстеження	Зовнішні симптоми ураження кущів винограду	Детекція GFLV методом ЗТ ПЛР	Ураження, % M± m
Одеська обл., Овідіопольський р-н ПП	Немає	+	1,3±0,5
Одеська обл., Овідіопольський р-н ТОВ	Симптоми асиметрії та редукції листя, нетипове жилкування	+	0,7±0,3
Одеська обл., Овідіопольський р-н АСТ	Світло-зелені плями на листі	-	-
Одеська обл., Овідіопольський р-н ДГ	На пагонах подвійні вузли та короткі міжвузля	+	2,1±0,3



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

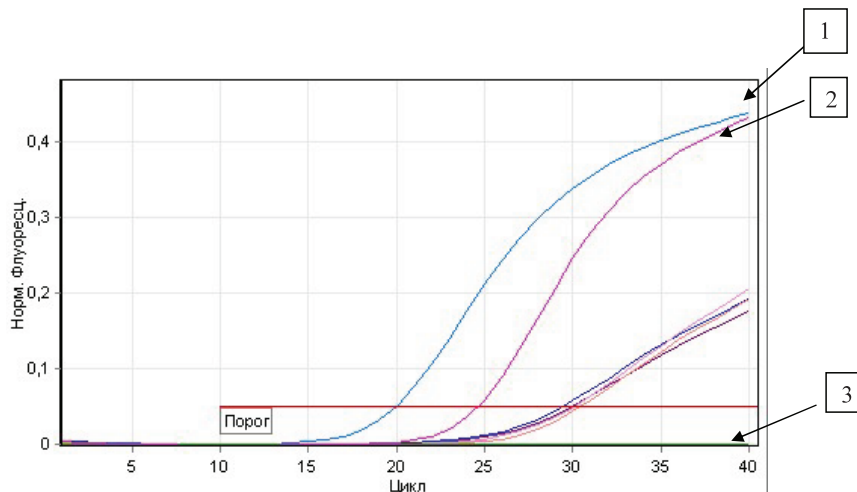
Діагностика вірусів коротковузля і скручування листя методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу забезпечує отримання найбільш якісних і точних результатів ПЛР-аналізу (рис. 3, 4), замінює детекцію продуктів ПЛР методом електрофорезу (рис. 2). При цьому немає сенсу відкривати і діставати продукти ампліфікації, що зводить до мінімуму ризик контамінації лабораторії продуктами ПЛР. Автоматич-

ний облік результатів дозволяє виключити суб'єктивні помилки при інтерпретації отриманих даних.

#### **Висновки**

1. Розроблено методіку виявлення вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР з детекцією флуоресценції в режимі реального часу.

2. За допомогою методів ІФА і ПЛР встановлено, що садивний матеріал як ім-



**Рис. 4. Детекція вірусу скручування винограду першого серотипу методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу: 1- зразок, заражений вірусом скручування першого серотипу; 2 - позитивний контроль, 3 - негативний контроль**



**Таблиця 2. Виявлення кущів винограду з симптомами вірусу скручування винограду першого серотипу в Одеській області**

Зона обстеження	Зовнішні симптоми ураження кущів винограду	Детекція GFLV методом ЗТ ПЛР	Ураження, % M± m
Одеська обл., Овідіопольський р-н ПП	Почервоніння листових пластинок і скручування їх країв донизу	+	2,7±0,2
Одеська обл., Овідіопольський р-н ТОВ	Ягоди не мають нормального забарвлення, мають підвищений рівень кислоти	+	1,7±0,3
Одеська обл., Овідіопольський р-н АСТ	Послаблений зріст кущів	+	2,9±0,3
Одеська обл., Овідіопольський р-н ДГ	На пагонах подвійні вузли та короткі міжвузля	-	-

портного, так і вітчизняного виробництва, латентно уражений вірусними хворобами.

3. Розроблено молекулярно-генетичний метод детекції вірусних патогенів.

4. ПЛР-метод дозволяє за короткий час протестувати велику кількість досліджуваного матеріалу.

### Література

1. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. – Кишинев: Штинца, 1985. – 236 с.
2. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue / Rowhani A., Chay C., Golino D. A., Falk B. W // *Phytopathology*. – 1993. – **83**, № 7. – P. 749–753.
3. Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions / Rowhani A., Mamingas M. A., Lile L. S. et al. // *Phytopathology*. – 1995. – **85**, № 3. – P. 347–352.
4. Identification of the agent of grapevine fleck disease / Boscia D., Martelli G. P., Savino V., Castellano M. A. // *Vitis*. – 1991. – **30**. – P. 97–105.
5. Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine / Minafra A., Grieco F., Gallitelli D., Martelli G. P. // *Bulletin OEPP/EPPO*. – 1995. – № 25. – P. 283–287.
6. Martelli G. P., Graniti A., Ercolani G. L. Nature and physiological effects of grape vine diseases // *Experientia*. – 1986. – № 42. – P. 933–942.
7. Maladies a virus et affections similaires de la vigne / Bovey R., Hewitt W. B., Martelli G. P. // *Payot, La Maison Rustique*. – Stuttgart, 1980. – 153 p.
8. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses / Rowhani A., Biardi L., Johnson R. et al. // 13 th ICVG Conference (Adelaide, 12–17 th March, 2000): Abstracts. – Adelaide, 2000. – P. 148.
9. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of Grapevine fanleaf virus in Tunisian grapevines / Fattouch S., M'Hirsi S., Acheche H., Marrakchi M., and Marzouki N. // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 2001. – № 19. – P. 235–244.

10. 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. – **81**, № 2. – P. 222–226.
11. Martelli G. P., Graniti A., Ercolani G. L. Nature and physiological effects of grape vine diseases // Experientia. – 1986. – № 42. – P. 933–942.

## АННОТАЦІЯ

**Конуп А.І.** *Вирусные болезни винограда на юге Украины // Биоресурсы и природопользование. – 2013. – 5, № 3–4. – С. 79–84.*

*Исследования различных сортов винограда на скрытое вирусносительство позволили установить зараженность вирусными болезнями, что связано с низким качеством посадочного материала. Методом иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией обнаружены и идентифицированы в посадочном материале винограда вирусы короткоузлия и скручивания листьев.*

## SUMMARY

**A. Konup.** *Virus's diseases of grapes in South Ukraine // Biological Resources and Nature Management. – 2013. – 5, № 3–4. – P. 79–84.*

*Investigation of different grape varieties to Secret of virus permits to set infestation viruse diseases due to the poor quality of planting material. By enzyme-linked immunosorbent and polymerase chain reaction with reverse transcription have been used for harmful grapevine viruses detection in the southern region of Ukraine in plant material found and identified viruses GLRaV-1 and GFLV.*