УДК 579.25:632:35:634.8.03/.5

ВІРУСНІ І ФІТОПЛАЗМОВІ ХВОРОБИ ВИНОГРАДУ. ДІАГНОСТИКА

А.І. Конуп, *молодший науковий співробітник*
В.Л. Чистякова, *науковий співробітник*
Л.О. Конуп, *кандидат біологічних наук*
ННЦ "Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова"

Сорти винограду, що ростуть в Україні, досліджували на зараженість вірусними і фітоплазмовими інфекціями за допомогою методів полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу. Встановлено, що сертифіковані клони винограду імпортного походження також інфіковано вірусними і фітоплазмовими інфекціями.

Вступ. Тестування винограду в лабораторних умовах є важливим тому, що дозволяє уникнути розповсюдження хвороб на нові виноградники. За останні роки виявлення вірусних хвороб винограду супроводжувалось трудомісткими і довгостроковими біологічними тестами [1]. Сьогодні більшість небезпечних вірусних хвороб винограду можна виявити швидкими лабораторними тестами. В деяких випадках при захворюванні винограду виявляються характерні симптоми, які можна легко ідентифікувати в польових умовах, однак найчастіше зустрічаються симптоми, які можуть бути викликані рядом причин, у т. ч. фізіологічними відхиленнями [2]. Для більшості вірусних хвороб характерні симптоми виявляються лише в певні пори року, наприклад, при вірусній хворобі скручування листя, його почервонінння на червоних сортах можна побачити в кінці літа або восени [3]. Дослідження таких кущів навесні дозволяє визначити статус захворювання. В період спокою неможливо виявити в польових умовах симптоми вірусної інфекції. Крім того, виноград, уражений рядом вірусів може не виявляти симптомів інфекції. Таку латентну ураженість можна визначити тільки в результаті лабораторного тестування.

Останнім часом на виноградниках України з'явилися небезпечні хвороби, які викликаються фітоплазмою і завдають значних збитків. Ці хвороби поширені в Італії, Франції, Югославії, Німеччині, але в Україні до 2004 р. не реєструвалися. Найбільш шкодочинними та поширеними серед таких хвороб в країнах Європи є золотисте пожовтіння винограду [4] та почорніння деревини винограду [5]. Ці дві хвороби за симптоматикою дуже схожі, ідентифікацію їх можна провести тільки лабораторними молекулярно-діагностичними методами [6, 7] .

У 2004 р. почорніння деревини виноградну було виявлено на території Одеської області на сорті Шардоне – найбільш чутливого до збудника фітоплазмової інфекції.

Надзвичайно важливо проводити діагностику таких хвороб, оскільки це запобігатиме їх розповсюдженню. Наші дослідження було спрямовано на розробку швидких і надійних методів діагностики.

Метою даної роботи було дослідження деяких сортів винограду імпортного походження на наявність вірусних і фітоплазмових хвороб.

Матеріали і методи. Дослідження проводили в лабораторії вірусології і мікробіології ННЦ "Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова" в 2013 р. Матеріалом слугували саджанці сортів Каберне Совіньйон і Шардоне виробництва Словенії, Німеччини, Франції і Молдови.

Для проведення лабораторної діагностики латентного ураження вірусними хворобами відбирали один саджанець винограду з кожної сотні дослідженої партії.

Вірусних антигенів виявляли методами імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням тест-систем фірми "Agritest" (Італія) та за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) з використанням реактивів фірми "АмпліСенс" (Росія). Виділення вірусів проводили у здерев'янілих пагонах. Зразки для проведення ПЛР готували за [8]. Реакційна суміш для проведення зворотньої транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила дейонізовану воду, 10Х ПЛР буфера (500 мМ KCl, 100 мМ Трис-HCl, pH 9,0), сахарозу (20 %) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксінуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дитіотриєтола (ДТТ), 10 пмоль кожного праймера, 1,25 Од Taq-полімерази, 8 Од ревертази, 1,5 мМ MgSO4 [1]. Використовували наступні пари праймерів: CPV і CPC (GLRaV-1), C 547 і H 229 (GLRaV-3), oligoC1 і oligoV1 (GFLV) [3]. У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка. В якості позитивного контролю використовували інфікований вірусами коротковузля і скручування листя матеріал винограду, люб'язно наданий доктором D. Boscia (Барійський університет, Італія), а в якості негативного — дейонізовану воду.

Зворотню транскрипцію проводили у термостаті за 52°С протягом 30 хв. Ампліфікація включала 35 циклів (94 °С — 30 с, 56 °С — 45 с, 72 °С — 60 с), а час елонгації в останньому циклі складав 7 хв. Для GLRaV-1 у ході дослідження температура відпалу була 52 °С, а для GFLV — 60 °С.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті "Терцик" фірми "ДНК - Технология" (Росія). Електрофорез проводили в 1,5% агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив до складу трис-боратного буфера для електрофорезу. Гель фотографували за допомогою відеосистеми "Mintron" в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів використовували маркер молекулярної ваги 800—200 пар основ нуклеотидів.

Для діагностики фітоплазмової інфекції виділення ДНК із здеревілих чубуків проводили за методикою N. Habili. Для цього брали зіскріб кортикального шару чубука 0,2 г, гомогенізували з 0,02 г метабісульфіта натрію і 2 мл екстракціоного буферу. В епендорф об'ємом 1,5 мл додавали 60 мкл 20 % саркозилу, інкубували при 65 °С 30 хв у термостаті, після чого додавали 0,6 мл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, струшували й завислі частки вилучали центрифугуванням при 12000 об/хв. Переносили 0,65 мл водної фракції в новий епендорф, додавали 0,4 мл суміші хлороформ/ізоаміловий спирт, добре струшували й центрифугували 10 хв при 14000 об/хв. Промивали осад 0,6 мл холодним 76% етанолом, який містив 100 мМ ацетату амонію. Добре висушували осад від етанолу й суспендували в 200 мкл ТЕ-буферу pH 8,0. Після чого додавали 0,5 мл холодного 100% етанолу й 3 мкл 3 М ацетата натрію pH 4,6—5,2; струшували і залишали на льоду 10 хв. Центрифугували за 4°С 15 хв при 14000 об/хв. Промивали осад 1 мл холодного 70% етанолу, добре висушували від етано-

лу й суспендували осад у 50 мкл ТЕ-буферу. Виділену ДНК діагностували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

ПЛР-ампліфікацію проводили з універсальною парою праймерів до різних ділянок геному, специфічною для фітоплазм fU5/rU3. Реакційна суміш (40 мкл) складалась із 4 мкл буферу 10х для ПЛР; 1,2 мкл 1,6 мМ MgCl2; 5 мкл 2,5 mM dNTPs; 2 мкл 5 μM праймеру fU5; 2 мкл 5 μM праймеру rU3; 0,4 мкл 5U/μl Taq ДНК-полімерази; 22,8 мкл деіонізованої води і 2 мкл нерозведеної виділеної ДНК фітоплазми.

Для збільшення виходу продукту ПЛР проводили дві ампліфікації, оскільки після першої продукт ПЛР візуально не спостерігався.

Ампліфікація з цими праймерами складалась із 35 циклів: 95 °С, 3 хв – денатурація, 55 °С, 1 хв - відпал і 72 °С, 6 хв 30 с – елонгація в програмованому термостаті "Терцик" фірми "ДНК – Технологія" (Росія). Для контролю чистоти реакції використовували деіонізовану воду. Продукти ПЛР (5 мкл) піддавали електрофорезу в 1,5% агарозному гелі в тріс-борат-ЕДТА-буфері (ТВЕ) (тріс-борат 90 мМ, ЕДТА 1 мМ; pH 8,2), використовуючи етидіум бромід (EtBr). Маркером молекулярної маси слугували фрагменти ДНК фага λ 2100 – 150 пар нуклеотидів. Продукт ПЛР мав молекулярну масу 826 п.о. Результат реєстрували на УФ-трансілюмінаторі з довжиною хвилі 312 нм і фотографували з допомогою відеосистеми "Biocom".

Результати досліджень. Було встановлено відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виноградників Одеської області. На насадженнях сорту Каберне Совіньйон з виноградників Одеської області виявлено декілька зразків, уражених вірусом скручування 1 серотипу; на насадженнях сорту Шардоне ідентифіковано фітоплазмове захворювання – почорніння деревини. Усього було досліджено 63 зразки сорту Каберне Совіньйон і 85 – Шардоне. На наявність вірусу скручування 1 і 3 серотипів досліджено 267 зразків обох сортів. Встановлено, що із загальної кількості проб 1 зразок інфіковано вірусом скручування 3 серотипу. Проведено візуальний санітарний контроль та вибіркову ідентифікацію хвороби за допомогою методу ЗТ-ПЛР на базових та сертифікованих маточниках загальною площею 50 га. Виявлено та видалено 7 рослин з візуальними симптомами ураження вірусом скручування листя винограду і 45 рослин з симптомами почорніння деревини.

За допомогою цього методу проведено перевірку значної частини матеріалу перспективних клонів, рекомендованих для подальшого розмноження, на латентне ураження вірусом скручування листя винограду. Усі тестовані кущі виявилися вільними від вірусу скручування листя.

В результаті досліджень методами ІФА і ПЛР встановлено, що латентно уражений вірусами скручування листя і коротковузля садивний матеріал виробництва Молдови і Словенії (табл.1, 2). Також ідентифіковано почорніння деревини у сорту Шардоне виробництва Франції, Німеччини та Італії (табл. 3).

Отже, використовуючи сучасні методи діагностики можна попередити заве-

Таблиця 1. Наявність вірусу скручування листя винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	+	+	-	-
Шардоне	+	-	-	-

Таблиця 2. Наявність вірусу коротковузля винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Молдова	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	+	-	+	-
Шардоне	+	-	-	-

Таблиця 3.Наявність фітоплазмової хвороби – почорніння деревини винограду в саджанцях імпортного виробництва

Сорт	Країна-імпортер			
	Італія	Словенія	Німеччина	Франція
Каберне Совіньйон	-	-	-	-
Шардоне	+	-	+	+

зення ураженого садивного матеріалу і його розповсюдження.

Висновки

1. Найбільш ураженим латентною формою вірусів скручування листя і коротковузля винограду є садивний матеріал виробництва Молдови.

2. Рослини сорту Шардоне виробництва Франції, Італії і Німеччини уражені фітоплазмовою інфекцією — почорнінням деревини винограду,

3. Використання сучасних методів діагностики — ІФА і ПЛР дозволяє в короткий строк виявити і ідентифікувати вірусні хвороби винограду і тим самим запобігти їх розповсюдженню.

Література

1. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. — Кишинев: Штинца, 1985. — С. 212—242.
2. Гнутова Р. В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. — М.: Наука, 1985. — С. 137—147.
3. Geographical distribution of elm yellows-related phytoplasmas in grapevine Flavescence doree outbreaks in Veneto (Italy) / Bertaccini A., Vibio M., Schaff D. et al. // 12th Meeting of ICVG, Lisbon, Portugal, Sept 28-Oct 2. — 1997. — P. 57—58.
4. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasmalike organism by dot hybridization and Southern blot analysis / Bertaccini A., Davis R.E., Lee I.-M. et al. // Plant Dis. — 1990. — **74**. — P. 40—43.
5. Langer M., Darimont H., Maixner M. Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit-phytoplasma by rflp-analysis and their association with grapevine, herbaceous host plants and vectors // 14th Meeting of ICVG, Locorrotondo (Bari), Italy, September 12—17, 2003. — 2003. — P. 71.
6. Differentiation of mycoplasmalike organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of apple proliferation MLO / Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bove J.M.] //Appl. Environ. Microbiol. —1994. — **60**. — P. 2916—2923.
7. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription — polymerase chain reaction / MacKenzie D. J., McLean M. A., Mukerji S., Green M. // Plant disease. — 1997. — **81**, № 2. — P. 222— 226.
8. 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.

АННОТАЦИЯ

Конуп А.І., Чистякова В.Л., Конуп Л.О. *Вирусные фитоплазменные болезни винограда. Диагностика//Биоресурсы и природопользование. – 2014. – **6**, № 3–4. – С. 77–80.*

Сорта винограда, произрастающие в Украине, изучали на зараженность вирусными и фитоплазменными инфекциями методом полимеразной цепной реакции и методом иммуноферментного анализа. Установлено, что сертифицированные клоны винограда импортного происхождения также инфифицированы этими инфекциями.

SUMMARY

A. Konup, V. Chystyakova, L. Konup. *Virus and phytoplasma diseases of grapes. Diagnostics //Biological Resources and Nature Management. – 2014. – **6**, № 3–4. – P. 77–80.*

Grapes grown in Ukrain are studied for infection of virus and phytoplasma infection by polymerase chain reaction and of immynofermentals analysis. It is found that the infected viruses disease and phytoplasma infection aren't appeared only ordinary landing material but also certificated regular planting material.