

УДК 632.3.01/.08

© 2019

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСНИХ, БАКТЕРІАЛЬНИХ І ФІТОПЛАЗМОВИХ ХВОРОБ НА ВИНОГРАДНИКАХ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ

А.І. Конун¹, Н.А. Мулюкіна², Л.О. Конун³

²доктор сільськогосподарських наук

³кандидат біологічних наук

ННЦ «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова» НААН

вул. 40-річчя Перемоги, 27, м. Одеса, 65496, Україна

e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

Надійшла 15.03.2019

Мета. Виявити вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду на виноградних насадженнях Одеської області. **Методи.** Польові, лабораторні. Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень у виноградарських господарствах Овідіопольського і Татарбунарського р-нів Одеської області. Ідентифікували збудників хвороб виноградних рослин серологічним (імуноферментний — ELISA) і молекулярно-біологічним (полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з електрофоретичною детекцією) методами. **Результати.** За візуального обстеження виноградних насаджень Овідіопольського району було виявлено рослини з симптомами скручування листя та в окремих випадках — симптомів, подібних до коротковузля і комплексу борознистості деревини винограду. Виноградні рослини із симптомами бактеріального раку та фітоплазмових хвороб виявили на виноградниках Овідіопольського і Татарбунарського р-нів. Наявність збудників вірусних (коротковузля, скручування листя, комплекс борознистості деревини винограду), фітоплазмових хвороб і бактеріального раку було підтверджено методами ELISA та ПЛР. Найвищий ступінь ураження збудником бактеріального раку відзначено на сорті Каберне Совіньйон, збудником фітоплазмової хвороби почорніння деревини — сорті Шардоне. **Висновки.** Найбільший відсоток рослин винограду, уражених вірусними і фітоплазмовими хворобами, виявили у виноградних господарствах Овідіопольського р-ну, збудником бактеріального раку — в Овідіопольському і Татарбунарському р-нах Одеської обл. На вірусні хвороби припадає приблизно 10% виявлених хвороб винограду, на бактеріальний рак — близько 25 і на фітоплазмові хвороби — 65%.

Ключові слова: віруси винограду, почорніння деревини винограду, ІФА, ПЛР, бактеріальний рак винограду, виноград.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201904-04>

Вірусні, фітоплазмові хвороби винограду рослин і бактеріальний рак винограду завдають значних збитків виноградарству в усьому світі [1–3]. Останнім часом, у зв'язку з істотним зменшенням виробництва

власного вітчизняного садивного матеріалу винограду і занепадом розсадницьких господарств, переважну більшість саджанців завозять з-за кордону, які, незважаючи на наявність сертифіката, що підтверджує

їх приналежність до біологічної категорії «сертифіковані», часто латентно уражені збудниками вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб. На територію півдня України із Франції, Італії, Німеччини, Австрії було завезено велику кількість садивного матеріалу винограду, ураженого збудниками бактеріального раку і фітоплазмової хвороби — почорніння деревини. Візуально, за винятком бактеріального раку, фітоплазмових хвороб та подекуди скручування листя, практично неможливо виявити хворі рослини винограду, тому для їх контролю необхідно проводити лабораторне тестування.

До шкодочинних вірусів рослин винограду, що входять до системи санітарної сертифікації садивного матеріалу, належать: вірус скручування листя винограду з 1-го по 9-й серотип (з переважною увагою до виявлення першого та третього серотипів) — *Grapevine leafroll-associated viruses* (1–9) (*GLRaV1*–9), вірус коротковузля винограду — *Grapevine fanleaf virus* (*GFLV*), вірус мармуровості винограду — *Grapevine fleck virus* (*GFkV*), вірус А винограду — *Grapevine virus A* (*GVA*) і вірус В винограду — *Grapevine virus B* (*GVB*) комплексу борознистості деревини винограду — *Rugose wood complex* (*RWC*) [4]. Збудником бактеріального раку винограду є грамнегативна бактерія *Rhizobium vitis* (*Agrobacterium tumefaciens*), яка має Ті-плазмід, що визначає пухлинні властивості [5]. Збудниками фітоплазмових хвороб винограду є фітоплазми — одноклітинні хемогетеротрофи зі складними потребами живлення, без клітинної стінки. Клітини фітоплазм оточені лише плазматичною мембраною, завтовшки приблизно 10 нм, що зумовлює їх пластичність і різноманітність обрисів клітин [6]. Серед фітоплазмових хвороб винограду найчастіше трапляється почорніння деревини *Bois noir*. Золотисте пожовтіння листя *Flavescence dorée*, яке є карантинним об'єктом, в Україні трапляється рідко.

Мета досліджень — провести фітосанітарне обстеження виноградних насаджень на наявність симптомів вірусних, фітоплазмових і бактеріальних хвороб виноградних рослин в Овідіопольському і Татарбунарському р-нах Одеської обл. та ідентифікувати збудників цих хвороб

лабораторними методами із визначенням ступеня ураження вірусними, бактеріальними і фітоплазмовими хворобами винограду.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для дослідження були виноградні рослини сортів: Каберне Совіньйон, Шардоне, Мерло, Сухоліманський білий промислових насаджень півдня України. Під час фітосанітарних обстежень насаджень упродовж 2-х років з рослин із характерними симптомами відбирали рослинний матеріал (листя і зелені пагони для ідентифікації збудників вірусних хвороб та дерев'янілі пагони для ідентифікації збудників фітоплазмових хвороб і бактеріального раку винограду згідно зі стандартом ISO 16578:2013 [7]. Ідентифікацію вірусів: 1- і 3-го серотипів вірусу скручування листя винограду (*GLRaV1*, 3), коротковузля винограду (*GFLV*), мармуровості (*GFkV*), вірусів А (*GVA*) і Б (*GVB*) комплексу борознистості деревини (*RWC*) винограду проводили методом ІФА-ELISA [8]. При дослідженні використовували комерційні тест-системи *Agritest* (Італія). Для ідентифікації збудника бактеріального раку використовували діагностичні набори *LOEWE* (Німеччина). Для ідентифікації збудників фітоплазмових хвороб винограду використовували класичну ПЛР з використанням універсальних пар праймерів R16(I)F1/R16(I)R1, R16(III)F2/R16(III)R1 та R16(V)F1/R16(V)R1: R16(1)F1-5'-TAAAGACCTAGCAATAGG-3', R16(1)R1-5'-CAATCCGAACTGAGACTGT-3', R16(III)F2-5'-AAGAGTGGAAACTCCC-3', R16(III)R1-5'-TCCGAACTGAGATTGA-3', R16(V)F1-5'-TAAAGACCTTCTTCGG-3', R16(V)R1-5'-TTCAATCCGTACTGAGACTACC-3' [9].

Синтез праймерів здійснений компанією «Fermentas, Литва». Екстракцію ДНК рослин проводили згідно з методикою [10]. Склад реакційної суміші (40 мкл): 4 мкл буфера 10x для ПЛР; 1,2 мкл 1,6 мМ $MgCl_2$; 5 мкл 2,5 мМ dNTPs; 2 мкл 5 μ М кожного праймера 0,4 мкл 5U/ μ l Taq ДНК-полімерази (АмпліСенс, Росія); 22,8 мкл деіонізованої води і 20 нг ДНК фітоплазми. Ампліфікування проводили в програмованому ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (НПО ДНК-Технологія, Росія), що включало 35 циклів: 95 °C/3 хв — денатурація, 55 °C/1 хв — відпал і 72 °C/6 хв

30 с — елонгація. Після першої ампліфікації суміш розводили у співвідношенні 1:50 [9] і вносили 2 мкл до реакційної суміші для проведення другої ампліфікації з тією самою парою праймерів. Для контролю чистоти реакції використовували деіонізовану воду, позитивним контролем у реакції була ДНК виноградних рослин сорту Шардоне, уражених почорнінням деревини. Специфічні амплікони розміром 780 п.н. виявляли методом електрофорезу в 1,5%-му агарозному гелі (ТБЕ-буфер, етидій бромід) протягом 40 хв за сили електричного струму 60 мА. Використовували маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п.н. (Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder). Одержані амплікони візуалізували і фотографували за допомогою відеосистеми «Mintron» в ультрафіолетовому випромінюванні (довжина хвилі 312 нм).

Для визначення видового складу фітоплазм, а саме почорніння деревини винограду, використовували пару праймерів STOL11f2/STOL11R1 [11] і маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п.н. (Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder). Ідентифікацію збудника бактеріального раку винограду (*Rhizobium vitis*) проводили методом ПЛР [12].

Результати досліджень. За фітосанітарного обстеження промислових виноградних насаджень на початку літа 2016–2017 рр. в Одеській обл. було виявлено кущі винограду сортів Шардоне, Сухолиманський білий, Мерло, Рислінг, Каберне Совіньйон з симптомами скручування листя винограду, які, як виявили пізніше за допомогою лабораторної діагностики, були частіше викликані фітоплазмою, рідше — вірусом скручування листя винограду. За ураження вірусом скручування листя, як правило, скручування листової пластинки було помірним, із наявністю ділянок тканин без зміни забарвлення уздовж жилок першого — третього порядків (рис. 1). Характерними симптомами фітоплазмових

хвороб є скручування листя, внаслідок якого листя набуває форми трикутника і, залежно від сорту, змінює колір від зеленого до жовтого у білоягідних сортів винограду та від зеленого до червоного — у темноїгідних сортів (рис. 2). При цьому цукор у ягодах знижувався на 10–20%, кущі відрізнялися уповільненим розвитком [13]. Кількість кущів із симптомами на окремих сортах була значною і становила до 25%. Прояви скручування листя винограду варіювали залежно від природи хвороби (фітоплазмоза або вірусна), ураженого сорту, періоду обстеження та метеоумов поточного сезону вегетації (табл. 1). Найсильніший прояв симптомів фітоплазмозової інфекції спостерігали у 2016 р., за умов збільшення кількості опадів. Серед сортів найвищі рівні ураження бактеріальним раком виявили на сорті Каберне Совіньйон, найвищі рівні ураження вірусною інфекцією (скручуванням листя) та фітоплазмою — на сорті Шардоне.

Через подібність симптомів для диференціації вірусних та фітоплазмозових хвороб слід проводити лабораторні випробування (рис. 1, 2). На кущах сорту Каберне Совіньйон було виявлено симптоми прояву коротковузля винограду у вигляді укорочення міжвузля, пригнічення росту, майже цілковитої відсутності врожаю. Симптоми прояву борознистості деревини винограду спостерігали на кущах сорту Шардоне у вигляді нерівномірного визрівання деревини, розтріскування, врожай був знижений, ягоди на гроні відрізнялися горошінням та зниженням вмісту цукру. Симптоми прояву вірусних



Рис. 1. Куш винограду із симптомами скручування листя (GLRaV), сорт Сухолиманський білий (Одеська обл., 2017 р.)

Примітка. Подібні симптоми спостерігали також на сортах Каберне Совіньйон, Шардоне, Сухолиманський білий.

1. Метеорологічні дані температури і опадів в Одеській області за період 2016–2017 рр.

Рік	Середньомісячна температура за рік, °С	Середня кількість опадів за рік, мм
2016	11,8	692,7
2017	11,8	438,8



Рис. 2. Куш винограду із симптомами фітоплазмової хвороби — почорніння деревини (*Vois noir*), сорт Шардоне (Одеська обл., 2017 р.)

Примітка. Подібні симптоми спостерігали також на сорті Шардоне.

хвороб є першим кроком для діагностики, але слід враховувати, що вони не завжди відповідають наявності вірусу в цих рослинах. На штамбах виноградних кущів, сортів Каберне Совіньйон і Мерло було виявлено симптоми бактеріального раку винограду у вигляді пухлин (рис. 3). З кущів винограду, що мали симптоми вірусних, фітоплазмових хвороб, відбирали рослинний матеріал для діагностики й ідентифікації збудників.



Рис. 3. Куш винограду, уражений збудником бактеріального раку винограду (*Rhizobium vitis*), сорт Каберне Совіньйон (Одеська обл., 2016 р.)

2. Результати ідентифікації вірусів методами ІФА в рослинах, що мали симптоми вірусних хвороб (2017 р.)

Сорт винограду із симптомами вірусних хвороб	Віруси виноградних рослин, ідентифіковані методами ІФА			
	GLRaV		GFLV	GVB
	1-й серотип	3-й серотип		
Каберне Совіньйон	+		+	—
Мерло рожеве	+	+	—	—
Сухолиманський білий	—	+	—	+
Шардоне	+	+	—	+

Примітка. «+» — ідентифіковано, «—» — не ідентифіковано.

У результаті проведення ІФА зі зразками виноградних рослин сортів Каберне Совіньйон, Мерло, Шардоне, Сухолиманський білий ідентифіковано віруси, що є збудниками хвороб скручування листя винограду 1- і 3-го серотипів, коротковузля (вірус коротковузля винограду) та комплексу борохливості деревини винограду (вірус В винограду) (табл. 2).

Установлено, що найбільший відсоток зараження виноградних рослин вірусними хворобами припадає на скручування листя винограду і становить приблизно 60% відносно ідентифікації всіх досліджених вірусів винограду.

Фітоплазмову хворобу почорніння деревини винограду було ідентифіковано

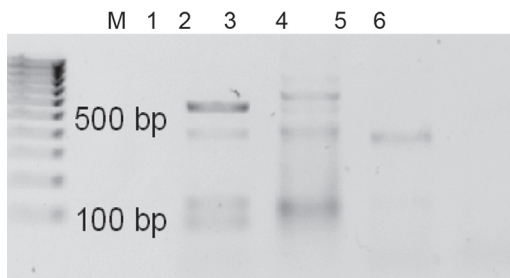


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ПЛР ДНК фітоплазми: 4 — позитивний зразок сорту Шардоне, розмір амплікона 780 п.н., М — маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п.н. (Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder)

на сорті Шардоне (рис. 4).

За фітосанітарного обстеження й ідентифікації збудників хвороб винограду встановлено, що найбільший відсоток ураженості хворобами припадає на виноградники Овідіопольського району. Ступінь ураженості виноградних насаджень збудником бактеріального раку вища у Татарбунарському районі і становить 70–80%, що може бути пов'язано із джерелом інфікованого садивного

матеріалу, сортовим складом насаджень та певною мірою із кліматичними умовами регіонів.

За аналізу співвідношення між рівнями ураження вірусними, фітоплазмовими хворобами та бактеріальним раком винограду встановлено, що 10% виявлених хвороб винограду припадає на вірусні хвороби, близько 25 — на бактеріальний рак і 65% — на фітоплазмові хвороби.

Висновки

У результаті фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Одеської області виявлено симптоми вірусних та фітоплазмових хвороб, а також прояви бактеріального раку винограду. Ідентифікація збудників вірусних хвороб методом ІФА показала, що вони викликаються вірусами скручування листя винограду (1- і 3-й серотипи), коротковузля винограду і вірусу В комплексу борозчатості деревини винограду. Методом ПЛР з гелі-електрофоретичною детекцією ідентифіковано збудника фітоплазмової хвороби — почорніння деревини — на сорті

Шардоне. Найбільший ступінь ураження збудником бактеріального раку виявлено на сорті Каберне Совіньйон.

Найбільший відсоток рослин винограду, уражених вірусними і фітоплазмовими хворобами, виявлено у виноградарських господарствах Овідіопольського району, збудником бактеріального раку — як в Овідіопольському, так і в Татарбунарському р-нах Одеської обл. Установлено, що приблизно 10% виявлених хвороб винограду припадає на вірусні хвороби, близько 25 — на бактеріальний рак і 65% — на фітоплазмові хвороби.

Конуп А.И., Мулюкина Н.А., Конуп Л.А.

ННЦ «Институт виноградарства и виноделия им. В.Е. Таурова» НААН, ул. 40-лет Победы, 27, г. Одесса, 65496, Украина; e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

Выявление вирусных, бактериальных и фитоплазменных болезней на виноградниках Одесской области

Цель. Определить наличие вирусных, бактериальных и фитоплазмозных болезней винограда на виноградных насаждениях Одесской области.

Методы. Полевые, лабораторные. Фитосанитарное обследование виноградников в виноградарских хозяйствах Овидиопольского и Татарбунарского р-нов Одесской обл. Идентифицировали возбудителей болезней виноградных растений серологическим (иммуноферментный — ELISA) и молекулярно-биологическим (полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией) методами. **Результаты.** При визуальном обследовании виноградных насаждений Овидиопольского р-на выявлены растения с симптомами скручивания листьев и в отдельных случаях — симптомами, подобными на поражение вирусом короткоузлия и вирусом В комплекса борозчатости древесины

винограда. Виноградные растения с симптомами бактериального рака и фитоплазменных болезней выявлены на виноградниках Овидиопольского и Татарбунарского р-нов. Наличие возбудителей вирусных (короткоузлия, скручивания листьев, вирусов комплекса борозчатости древесины винограда), фитоплазменных болезней и бактериального рака подтверждено методами ELISA и ПЦР. Высокая степень поражения возбудителем бактериального рака отмечена на кустах сорта Каберне Совіньйон, возбудителем фитоплазменной болезни почернения древесины — на сорте Шардоне.

Выводы. Наибольший процент растений винограда, пораженных вирусными и фитоплазменными болезнями, оказался в виноградарских хозяйствах Овидиопольского района, возбудителем бактериального рака — в Овидиопольском и Татарбунарском р-нах Одесской обл. Установлено, что примерно 10% выявленных болезней винограда вирусные, около 25 — бактериальный рак и 65% — фитоплазменные болезни.

Ключевые слова: вирусы винограда, почернение древесины винограда, ИФА, ПЦР, бактериальный рак винограда, виноград.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk201904-04>

Konup A., Muliukina N., Konup L.

NSC «V.Ye.Tairov Institute of viticulture and winemaking» of NAAS, 40-richcha Peremohy Str., 27, Odesa, 65496, Ukraine; e-mail: lkmicrobiol@ukr.net

Detection of virus, bacterial and phytoplasmic diseases on vineyards of Odesa oblast

The purpose. To determine presence of virus, bacterial and phytoplasmic diseases of grape on grape plantings of Odesa oblast. **Methods.** Field, laboratory. Fytosanitary diagnostic study of vineyards in grape-cultivation farms (Ovidiopol and Tatarbuniar regions of Odesa oblast). They identified causal organisms of diseases of grape plants using serological (immunoenzymatic — ELISA) and molecular-biological (polymerase chain reaction (PCR) with electrophoretic detection) methods. **Results.** At visual diagnostic study of grape plantings in Ovidiopol region they detected plants with symptoms of leaf curl and on occasion — with symptoms similar to that caused by fanleaf virus and virus of a complex striation of wood of a grape. Grape plants

with symptoms of bacterial cancer and phytoplasmic diseases are detected on vineyards of Ovidiopol and Tatarbuniar regions. Presence of causal organisms of virus (fanleaf of grapevine, leaf curls, and viruses of a complex striation of wood of a grape), phytoplasmic diseases and bacterial cancer is confirmed by methods of ELISA and PCR. High scale of defeat is registered by the causal organism of bacterial cancer on scrubs of variety Cabernet Sovinion, by the causal organism of phytoplasmic disease of wood blackening — on variety Shardone. **Conclusions.** The greatest percent of plants of grape struck by virus and phytoplasmic diseases, has appeared in Ovidiopol region, by the causal organism of bacterial cancer — in Ovidiopol and Tatarbuniar regions of Odesa oblast. It is established that approximately 10% of the determined diseases of grape are virus ones, nearby 25 are bacterial cancer, and 65% are phytoplasmic diseases.

Key words: viruses of grape, wood blackening, IFA, PCR, bacterial cancer of grape, grape.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovysnyk201904-04>

Бібліографія

1. Almeida R.P.P., Daane K., Bell V. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*. 2013. V. 4, P. 94. doi: 10.3389/fmicb.2013.00094
2. Келдыш М.А. Вирусы, вириды и микоплазмы растений. Москва: РУДН, 2003. 157 с.
3. Леманова Н.Б., Гатина Э.Ш. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур. Кишинев: Штиинца, 1991. 116 с.
4. Martelli G.P. Grapevine Virology Highlights: 2010–2012. *Proceedings of the 17th Congress of ICVG*. Davis, 2012. P. 13–31.
5. Vizitiu (Bălăşoiu) Diana, Dejeu L. Crown gall (Agrobacterium spp.) and grapevine. *J. of Horticulture, Forestry and Biotechnology*. 2011. V. 15(1). P. 130–138.
6. Борхсениус С.Н., Чернова О.А. Микоплазмы: молекулярная и клеточная биология, патогенность, диагностика. Ленинград: Наука, 1989. 156 с.
7. 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>
8. Esteban A., Engel E.A., Escobar P.F. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *J. of Virological Methods*. 2009. V. 2, Is. 163. P. 445–451. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.11.009
9. Lee I.-M., Gundersen D.E., Hammond R.W. and Davis R.E. Use of Mycoplasma-like Organism (MLO) Group-Specific Oligonucleotide Primers for Nested-PCR Assays to Detect Mixed-MLO Infections in a Single Host Plant. *The American Phytopathological Society*. 1994. V. 84. P. 559–566. doi: 10.1094/Phyto-84-559
10. Sahar A. Youssef, Yasmin Sayed, Osama S. Hassan et al. Universal and Specific 16S-23S rRNA PCR Primers for Identification of Phytoplasma associated with sesame in Egypt. *International J. of Advanced Research in Biological Sciences*. 2017. V. 4, Is. 7. P. 191–200. doi: <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.07.024>
11. Avramov Z., Gillet J., Laginova M. First Detection of Stolbur Phytoplasma in Grapevines (Vitis vinifera cv. Merlot) Affected with Grapevine Yellows in Bulgaria. *J. Phytopathology*. 2008. V. 156, P. 112–114. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01339.x
12. Haas Jerry H., Moore Larry W., Ream Walt, Manulis Shulamit. Universal PCR Primers for Detection of Phytopathogenic Agrobacterium Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. V. 61. № 8. P. 2879–2884.
13. Конуп Л.А., Гайдай А.Е., Милкус Б.Н. Бактериальный рак винограда в Украине. *Вісник ОНУ*. 2001. Вип. 4. Т. 6. С. 181–183.