

Ніколаєва Н. І.

УДК: 632.38+634.22

**ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСІВ КОМПЛЕКСУ БОРОЗНИСТОСТІ ДЕРЕВИНИ
НА ВИНОГРАДНИХ НАСАДЖЕННЯХ ОДЕСЬКОЇ ОБЛАСТІ****Н. І. НІКОЛАЄВА**, науковий співробітник<https://orcid.org/0000-0003-1278-2188>**Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства
ім. В.Є. Таїрова» НААН України**E-mail: lkmicrobiol@ukr.net<https://doi.org/dopovidi2022.03.001>

Анотація. Віруси винограду наносять великої шкоди виноградним насадженням півдня України, особливого значення мають віруси комплексу борознистості деревини (*Rugose wood complex* (англ.) – RWC). Метою досліджень було виявлення наявності симптомів вірусів цього комплексу на виноградних насадженнях в Одеській області і їх ідентифікація. Методи. Для проведення цих досліджень використовували фітосанітарне обстеження на наявність симптомів вірусів комплексу борознистості деревини, для ідентифікації вірусів застосовували метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією у режимі реального часу (ЗТ-РЧ-ПЛР). Результати. В результаті фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Болградського, Ізмільського і Овідіопольського районів Одеської області було виявлено симптоми вірусного ураження виноградних рослин. Вперше було ідентифіковано віруси винограду модифікованим методом ЗТ-РЧ-ПЛР, підібрані умови проведення діагностики. Висновки і перспективи. В результаті фітосанітарного обстеження виявлено віруси винограду, що належать до комплексу борознистості. Виявлено і ідентифіковано ураження виноградних кущів вірусами комплексу борознистості деревини на виноградних насадженнях Болградського району Одеської області. Під час проведення діагностики було оптимізовано параметри ПЛР, а саме, відпрацьовано температуру відпалу та концентрацію магнію. Одержані дані дозволять своєчасно виявити віруси комплексу борознистості винограду, які можуть призвести до значного зниження врожаю і запобігти їх розповсюдженню.

Ключові слова: ЗТ-РЧ-ПЛР, виноград, вірус А винограду (GVA), вірус В винограду (GVB), борознистість деревини *Rupescris* (RSPaV), Ямчатість деревини ЛН 33 (LN 33 stem grooving)

Актуальність. Віруси, що викликають вірусні хвороби наносять великої шкоди виноградникам в усьому світі. Кількість їх значна і з кожним роком з'являються все нові форми вірусів, які являються

збудниками вірусних хвороб виноградних рослин. Вони негативно впливають на приживлюваність та розвиток виноградних рослин, якість продукції виноградарства зокрема, зниження цукристості, вихід

Ніколаєва Н. І.

саджанців зі шкілки, а також довговічність виноградних кущів. Виробництво садивного матеріалу із заражених вірусами чубуками прищеп і підщеп приводить до поширення хворих рослин на виноградних насадженнях, що веде до зниження ефективності експлуатації виноградників та збільшення економічних затрат. Серед цих вірусів найбільш шкідливими є віруси, що входять до комплексу борознистості деревини (*Rugose wood complex*), а саме: борознистість деревини Рупестріс – *Rupestris stem pitting* (RSPaV); вірус В винограду (опробковіння кори) – *Grapevine virus B* (GVB); вірус А винограду (ямчатість деревини Кобера) – *Grapevine virus A* (GVA); ямчатість деревини ЛН 33 – *LN 33 stem grooving* (англ.). Ці віруси входять до системи сертифікації Європейського Співтовариства і при виробництві саджанців необхідно обов'язкове тестування на наявність цих вірусів [1].

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Віруси, які входять до складу RWC належать до родів *Foveavirus* та *Vitivirus* [2, 3] і характеризуються різними симптомами хвороб, а саме утворення борозен, ямок на штабмі та рукавах рослини [4] (рис. 1).

Віруси поширюються як через уражений садивний матеріал у період щеплення, так і через переносників - борошнистих червеців (*Pseudococcus affinis*, *Ps. longispinus*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*) та механічним шляхом [5, 6].

Серед усіх цих хвороб комплексу RWC борознистість деревини Рупестріс найбільш розповсюджена у світі, частіше всього протікає у латентній формі, не викликаючи характерних симптомів та не впливаючи на ріст і врожайність кущів [7].

Мета. Метою даної роботи було виявлення наявності RWC на виноградних насадженнях Одеської області і ідентифікація цих вірусів за допомогою ЗТ-РЧ-ПЛР та оптимізація параметрів проведення реакції для виявлення GVA, GVB, RSPaV.

Методи. В роботі використовували фітосанітарне обстеження виноградних насаджень в Овідіопольському, Болградському і Ізмаїльському районах Одеської області, загальної площі 500 га. Зразки з симптомами ураження вірусів і без них відбирали для проведення діагностики методом ПЛР у реальному часі зі зворотною транскрипцією з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією (*Real time PCR*).

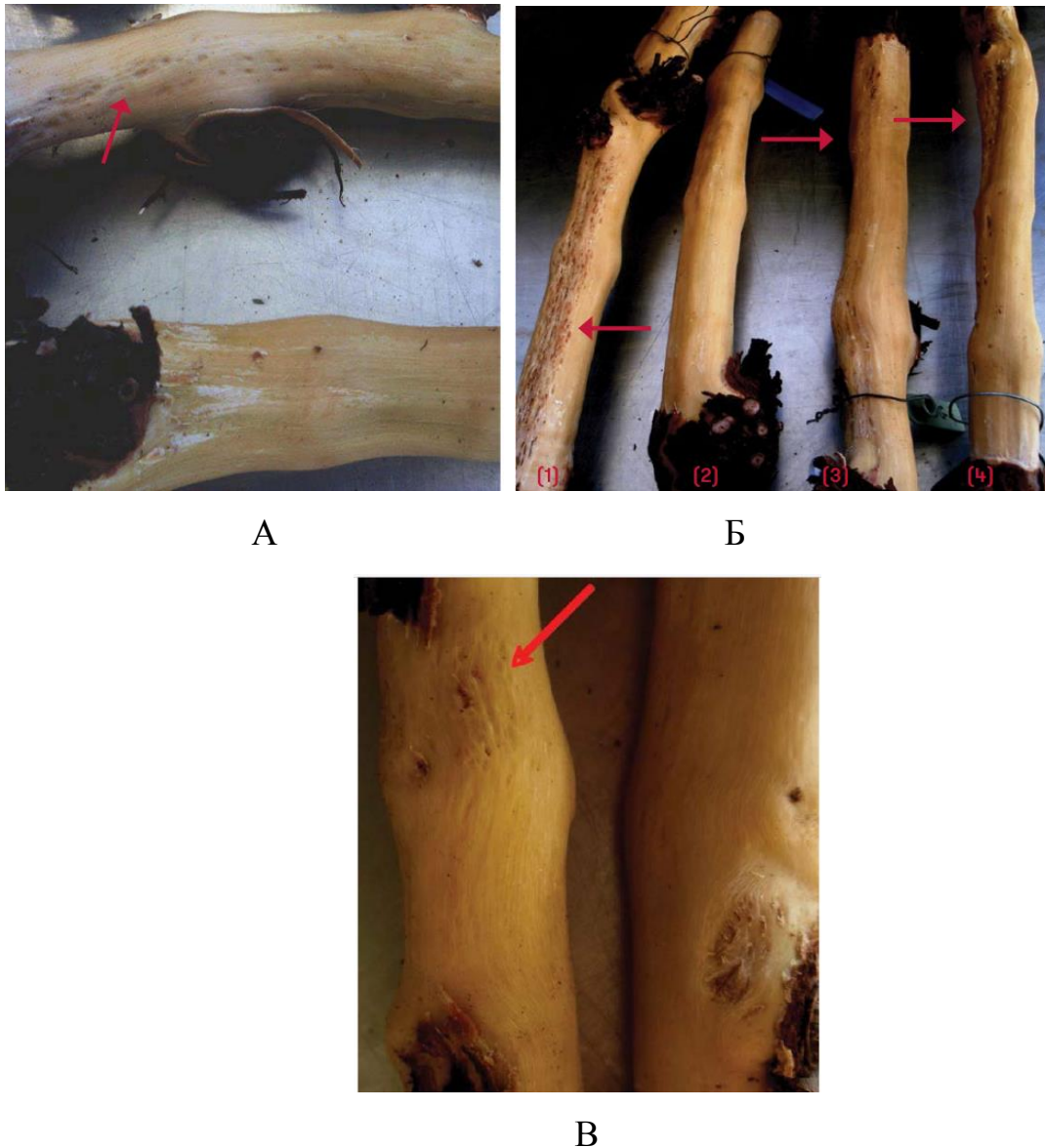


Рис. 1. А - симптоми ураження лози вірусом ямчастості стебла *Vitis rupestris* - GVA (верхня частина, стрілка); Б - симптоми ураження виноградної лози *Vitis rupestris* вірусом борознистості деревини Рупестріс (RSPaV) (1, 3 і 4, стрілки); 2- неуражений зразок лози; В - симптоми ураження виноградної лози вірусом В винограду (опробковіння кори - (GVB) [4]

Результати дослідження та їх обговорення. При обстеженні виноградних насаджень в Болградського району Одеській області було виявлено кущі

винограду з симптомами комплексу борознистості деревини винограду, а саме опробковіння кори на штаббі, що характерно для прояву ураження вірусом Б (рис. 2).



Рис. 2. Симптоми вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду на штабмі сорту Каберне Совіньйон (Одеська обл., 2020 р.)

Воднчас кущі відставали в рості, визрівання деревини було нерівномірне і деревина розтріскувалась, врожай був значно знижений, ягоди на гроні були малого розміру і цукор знижений. Молоде листя на протязі всього вегетаційного періоду мало світло – жовтий колір.

Для ідентифікації вірусів комплексу RWC відбір, зберігання і підготовку зразків рослин винограду проводили згідно стандарту ISO 16578:2013 [8].

Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно методики авторів [9, 10], листя або зішкріб здерев'янілих пагонів, у кількості 100 мг, поміщали у гомогенізатор (*Tube-mill control*, ІКА, Китай) ретельно подрібнювали, заливали 2 мл екстракційного (GGB) буферу: Na_2CO_3 – 1,59 г/л, NaHCO_3 – 2,93 г/л, 2 % PVP-40, 0,2 % BSA, 0,5 г/л Tween-20, 10 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (рН 9,0) і інкубували при 95 °С 10 хв. в термостаті «Драй-блок» TDB-120

(Biosan, Латвія). Після цього зразки витримували в холодильнику 3 години при +4 °С.

Виділення РНК вірусів проводили згідно методики [11], а саме: 2 мкл зразка вносили в 23 мкл реакційної суміші ($\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 12,0 мкл; 10×ПЦР-буфер – 2,5 мкл; сахароза + крезол – 2,5 мкл; 4 мМ dNTP – 1,25 мкл (1,76 мМ -2,84 мкл); DTT (дітіотрейтол)– 1,24 мкл; pr1 (10 pmol) – 1,25 мкл; pr2 (10 pmol) – 1,25 мкл, Taq-полімераза (2,5 u/μl) (*Pfu DNA, Fermentas*, Литва) – 0,25 мкл, ревертаза (200 u/μl) (*RevertAid™ M-MuLV*, Fermentas, Литва) – 0,04 мкл, Mg^{2+} (50mM) – 0,75 мкл, покривали шаром олії для ПЛР і проводили ЗТ-ПЛР.

ЗТ-ПЛР у режимі реального часу проводили з використанням прямого і зворотного праймерів, флуоресцентно мічених ДНК-зондів, реакційної суміші, в кількості 20 мкл ($\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 8,5 мкл; 10× ПЦР-буфер –

Ніколаєва Н. І.

2,5 мкл; сахароза + крезол – 2,5 мкл; 4мМ dNTP – 2,5 мкл (1,76 мМ – 2,84 мкл); DTT – 1,24 мкл; *pr1* – 0,5 мкМ; *pr2* – 0,5 мкМ; флуоресцентний зонд – 0,1 мкМ, Taq-полімераза (2,5 у/μl) (*Pfu DNA, Fermentas*, Литва) – 0,25 мкл; ревертаза (200 у/μl) (*RevertAidTM M-MuLV, Fermentas*, Литва) – 0,04 мкл; Mg^{2+} – 3,0 мМ і 5 мкл НКЗ, або ПКЗ, або внутрішній контроль, або досліджуваний зразок (на дно пробірки) [12]. Концентрація прямого, зворотного праймерів, флуоресцентних ДНК-зондів були підібрані емпірично. Для контролю проведення реакції використовували негативний контрольний зразок (НКЗ) – 1хПЛР-буфер і позитивний контрольний зразок (ПКЗ) – біоматеріал із тест-системи для проведення ІФА (*AgriTest*, Італія). Для контролю виділеної РНК використовували внутрішній контроль, синтезований для ампліфікації мРНК із мітохондрій винограду [12, 13].

Для ідентифікації вірусів ЗТ-ПЛР в режимі реального часу використовували наступні праймери і мічені зонди (*Fermentas*, Литва) згідно [12]: до вірусу А комплексу борознистості деревини винограду (*GVA*): GVA-77 f – CGACCGAAATATGTACCTGAATA CTC – прямий; GVA-192 r1 – TTGCTAGCTTTAGGACCTACTAT ATCTACCT – зворотний; GVA-192 r2 – CTTGCTAGCCtTAGGtCCTACTATA

TCTACCT – зворотний; GVA-104 p – CTTCGGGTACATCGCCTTGGTTCG – зонд. До вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду (*GVB*): GVB-92 f1 – CTAGGAGTGCGGCTAAACGAA – прямий; GVB-95 f2 – GGAGTGCGGCCAAACGA – прямий; GVB-202 r1 – CCTTAACCTCGTCCTGTGATATGG T – зворотний; GVB-119p2 – ACCGTTACGGCCGTTGTTACTGTT GTGGTAG – зонд

Зворотна транскрипція і ампліфікація включала наступні цикли: за 50 °C упродовж 2 хв., 95 °C упродовж 15 хв. і 45 циклів 95 °C упродовж 15 сек. і 57° C – 1 хв. Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері *Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія)*. Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів проводили за допомогою програмного забезпечення програми *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7*. Позитивним вважався зразок, при аналізі якого спостерігається зростання флуоресцентного сигналу на одному з колірних каналів ампліфікатора.

У результаті оптимізації умов проведення ЗТ-ПЛР у реальному часі було підібрано вдалу концентрацію $MgCl_2$, для найбільшої інтенсивності флуоресцентного сигналу та було встановлено, що крива флуоресцентного сигналу була більш

Ніколаєва Н. І.

оптимальною при концентрації $MgCl_2$ в діапазоні 3,0 - 2,5 мМ.

У результаті проведених досліджень ідентифіковано тільки

вірус Б комплексу борознистості винограду, інші віруси не було виявлено (рис. 3).

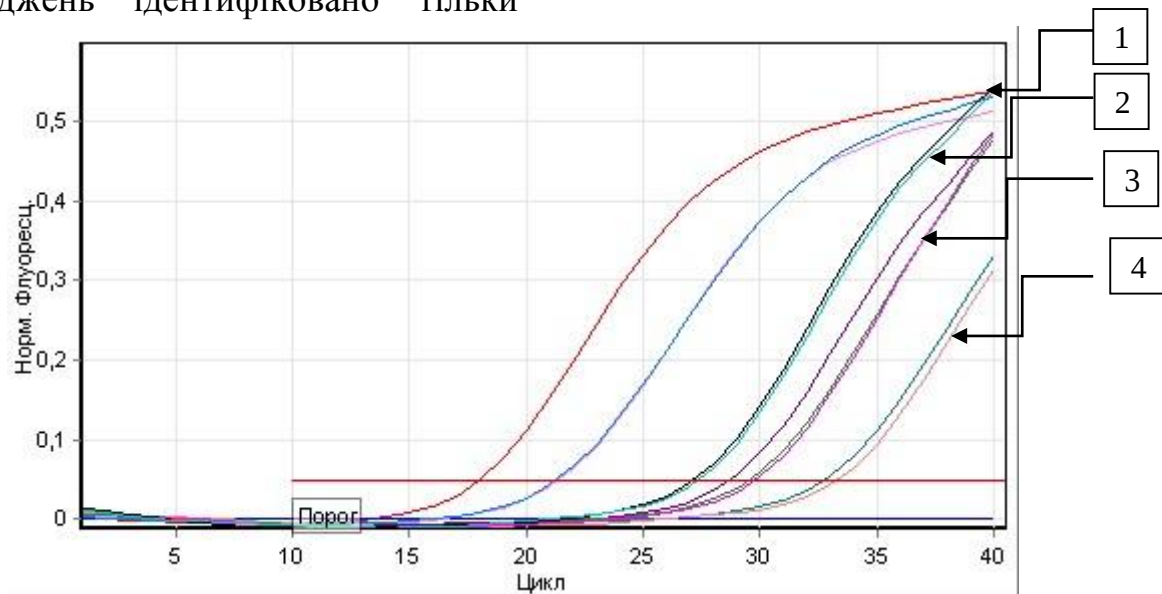


Рис. 3. Детекція вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду (GVB) методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу. Залежність інтенсивності сигналу флуоресценції від температури відпалу праймерів. Де: 1 – 50 °C; 2 – 48 °C; 3 – 45 °C; 4 – 40 °C.

У результаті випробування різних температур відпалу в реакції, а саме: 40 °C, 45 °C, 48 °C, 50 °C встановлено, що оптимальною температурою відпалу виявилась $T_{від} = 48^{\circ} - 50^{\circ}C$, при цьому інтенсивність флуоресцентного сигналу детекції вірусів найбільша.

Висновки і перспективи подальших досліджень. В результаті фітосанітарного обстеження виноградних насаджень Овідіопольського, Болградського і Ізмайльського районів Одеської області біло виявлено 2 куща винограду з симптомами вірусної

хвороби комплексу борознистості винограду. Для діагностики вірусної хвороби було вперше в Україні застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією у реальному часі з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією, було підібрані і оптимізовані умови проведення реакції. У результаті ідентифікації збудника комплексу борознистості деревини методом ЗТ-РЧ-ПЛР встановлено, що виноградні кущі було уражено вірусом Б комплексу (GVB).

Список використаних джерел

1. Walter B., Martelli G. P. Considerations on grapevine selection and certification. *Vitis*. 1998. V. 37. № 2. P. 87 – 90.
2. Bertin S, Mannini F, Bosco D, Gambino G, Cuzzo D and Gribaudo I. Spread of GVA, GLRaV-1 and -3 and role of the mealybug vector *Heliococcus bohemicus* in a vineyard of Langhe (Northwestern Italy). *Extended abstracts of the 16th Meeting of ICVG, Dijon Le Progrès Agricole et Viticole, Hors Série. Spécial Congrès ICVG*. 2009. P. 279-280;
3. Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF and Dolja VV. Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*. 2007. №45, P. 73–100.
4. Rugose wood – associated viruses. Fiona Constable and Brendan Rodoni. *Department of Primary Industries (DPI) Wine Australia for Australian Wine*. 2011. P.1-5.
5. Краєв В. Г. Современная классификация и номенклатура вирусных растений. *Мікробіологічний журнал*. 2001. Т. 63. № 2. С. 20 – 66.
6. Minafra A. Rugose wood of grapevines. *XIIIth ICVG Meeting: Abstracts. Adelaide, Australia, 12 – 17 March 2000. Adelaide*. 2000. P. 30 - 34.
7. Meng B. Z., Johnson R., Peressini S., Forsline P. L., Gonsalves D. Rupestris stem pitting-associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *Eur. J. Plant Pathol.* 1999. V. 105. P. 191 – 199.
8. 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*. Режим доступу: <http://www.eppo.org>.
9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018. №35. P. 1547-1549.
10. Б.Н. Мілкус, Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя. *Мікробіологічний журнал*. 2005. Т. 67. №1. С. 41- 48.
11. Rowhani A. Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. *Proceedings of XIII International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine. Adelaide*. 2000. P. 82.
12. Fatima Osmana, Christian Leutenegger, Deborah Golino, Adib Rowhani. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 149. P. 292–299.
13. Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., and Brlansky, R. H. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *J. Virol. Methods*. 2005. Vol. 129. P. 47-55.

References

1. Walter B., Martelli G. P. (1998). Considerations on grapevine selection and certification. *Vitis*. V. 37. № 2. p. 87 – 90.
2. Bertin S, Mannini F, Bosco D, Gambino G, Cuzzo D and Gribaudo I. (2009). Spread of GVA, GLRaV-1 and -3 and role of the mealybug vector *Heliococcus bohemicus* in a vineyard of Langhe (Northwestern Italy). *Extended abstracts of the 16th Meeting of ICVG, Dijon Le Progrès Agricole et Viticole, Hors Série. Spécial Congrès ICVG*. p. 279-280;
3. Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF and Dolja VV. (2007). Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*. №45, p. 73–100.
4. Rugose wood – associated viruses. Fiona Constable and Brendan Rodoni. (2011). *Department of Primary Industries (DPI) Wine Australia for Australian Wine*. p.1-5.
5. Krayev V. G. (2001). Sovremennaya klassifikatsiya i nomenklatura virusov rasteniy. [Modern classification and nomenclature of plant viruses] *Microbiological Journal*. T. 63. № 2. p. 20 – 66. [in Ukrainian].
6. Minafra A. (2000). Rugose wood of grapevines. *XIIIth ICVG Meeting: Abstracts. Adelaide, Australia, 12 – 17 March 2000. Adelaide*. p. 30 - 34.
7. Meng B. Z., Johnson R., Peressini S., Forsline P. L., Gonsalves D. (1999).

Ніколаєва Н. І.

Rupestris stem pitting-associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. Eur. J. Plant Pathol. V. 105. p. 191 – 199.

8. 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. Режим доступу: <http://www.eppo.org>.

9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. №35. p. 1547-1549.

10. B.N. Milkus, Konup L.O., Zhun'ko I.D., Limans'ka N.V. (2005). Testuvannya deyakikh sortiv vynuogradu na nayavnist' zbudnyka bakterial'noho raku i virusiv korotkovuzlyia ta skruchuvannya lystya [Testing of some grape varieties for the

presence of crown gall and short-knot viruses and leaf curl]. Microbiological Journal. T. 67. №1. p. 41- 48. [in Ukrainian].

11. Rowhani A. (2000). Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. Proceedings of XIII International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine. Adelaide. p. 82.

12. Fatima Osmana, Christian Leutenegger, Deborah Golino, Adib Rowhani. (2008). Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. Journal of Virological Methods. Vol. 149. p. 292–299.

13. Roy, A., Fayad, A., Barthe, G., and Brlansky, R. H. (2005). A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. J. Virol. Methods. Vol. 129. p. 47-55.

DETECTION OF VIRUSES OF THE RUGOSE WOOD COMPLEX ON VINEYARDS OF THE ODESSA REGION

N. Nikolaeva

Abstract. Grape viruses cause great damage to vineyards in the south of Ukraine, especially viruses of the wood complex of the furrow complex (Rugose wood complex) (eng. - RWC). The aim of the research was to identify the presence of symptoms of viruses of this complex on vineyards in Odessa region and their identification. *Methods.* To conduct these studies, phytosanitary examination for the presence of wood furrow complex viruses was used, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify viruses. *Results.* As a result of phytosanitary inspection of vineyards of Bolgrad, Izmiil and Ovidiopol districts of Odessa region, symptoms of viral damage to grape plants were revealed. For the first time, grape viruses were identified by a modified RT-PCR method, and diagnostic conditions were selected. *Conclusions and prospects.* As a result of phytosanitary inspection, grape viruses belonging to the furrow complex were found. The lesions of grape bushes by viruses of the wood furrow complex on the vineyards of the Bolgrad district of Odessa region were detected and identified. During the diagnosis, the PCR parameters were optimized, namely, the annealing temperature and magnesium concentration were tested. The obtained data will allow timely detection of viruses of the grape furrow complex, which can lead to a significant reduction in yield and prevent their spread.

Key words: RF-PCR, grapes, Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Rupestris stem pitting (RSPaV), LN 33 stem grooving