

**Б.Н. Мілкус, Л.О. Коцун,
І.Д. Жуцько, Н.В. Ліманська**

Одеський національний університет
Вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ТЕСТУВАННЯ ДЕЯКИХ СОРТІВ ВИНОГРАДУ НА НАЯВНІСТЬ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ І ВІРУСІВ КОРОТКОВУЗЛЯ ТА СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ

Деякі підщепні і прищепні сорти винограду, які культивуються в Україні, досліджували на інфікованість пухлиноутворювальними агробактеріями, вірусом коротковузля винограду і вірусами скручування листя винограду 1-го та 3-го серотипів за допомогою методів імуноферментного аналізу і полімеразної ланцюгової реакції. У ході дослідження параметри полімеразної ланцюгової реакції були модифіковані. Показано, що інфікованими збудником бактеріального раку виявилися не тільки рядовий садивний матеріал, а й сертифіковані клони винограду. Клоновий матеріал виявився вільним від вірусів коротковузля і скручування листя винограду, у той час як рядовий садивний матеріал був інфікований фітовірусами. Одержані результати вказують на необхідність включення *Agrobacterium vitis* у перелік збудників, тестування на наявність яких сертифікованого садивного матеріалу винограду є обов'язковим.

К л ю ч о в і с л о в а: *Agrobacterium vitis*, вірус коротковузля винограду, вірус скручування листя винограду, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз.

Agrobacterium vitis — пухлиноутворювальні бактерії, які уражують виноград, — здатні викликати безсимптомну інфекцію як на прищепних, так і на підщепних сортах. Бактерії, потрапивши крізь пошкодження до рослини, переносяться по судинній системі і призводять до системної інфекції [7, 14].

Сорти винограду чутливі до бактеріального раку різною мірою [6, 11]. Серед підщепних сортів більш чутливими до зараження *A. vitis* є *Vitis berlandieri* × *Vitis riparia* Кобера 5ББ, *V. berlandieri* × *V. riparia* СО₄. Пухлини виявляються на цих сортах частіше, ніж на сортах *V. riparia* × *V. rupestris* 101-14 і *V. riparia* × *V. rupestris* 3309 [6]. Згідно з даними літератури, підщепні сорти *V. riparia* і *V. rupestris* загалом більш резистентні до ураження бактеріальним раком, ніж сорти *V. vinifera* [8, 24].

© Б.Н. Мілкус, Л.О. Коцун, І.Д. Жуцько, Н.В. Ліманська, 2005

Високочутливими прищеними сортами винограду є Каберне Совінйон, Мускат олександрійський, Мерло, Восторг, Страшенський [4]. Ступінь ураження певного сорту залежить від кліматичної зони культивування винограду [7].

Одним із найбільш небезпечних для винограду фітовірусів є вірус скручування листя (GLRaV), широко розповсюджений у світі. Виділяють 7 серологічно відмінних типів кластеровірусів (GLRaV 1–7). Найпоширенішими є перший і третій серотипи (GLRaV-1 і GLRaV-3). Хвороба головним чином передається із садивним матеріалом. Однак у деяких регіонах має місце розповсюдження за допомогою кокцид [1, 18]. Типові симптоми скручування на червоних сортах винограду проявляються у вигляді почервоніння між жилками та скручування листкової пластинки донизу. На інших сортах винограду симптоми скручування можуть не спостерігатися, але деякі фізіологічні зміни слугують індикаторами наявності вірусної інфекції [16].

Дуже небезпечним вірусом є також вірус коротковузля винограду (GFLV). Цей шкідливий вірус поширюється за допомогою нематод виду *Xiphinema index* [1, 10]. Симптоми хвороби залежать від чутливості сорту та вірулентності патогену. Спочатку на листі з'являються світло-зелені плями, пізніше – симптоми асиметрії та редукції листя, петннове жилкування. На пагонах утворюються подвійні вузли й короткі міжвузля [1, 16].

Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє розізнати куці з латентною інфекцією і запобігти заготовленню з них дози для вегетативного розмноження рослин. Багато років діагностика вірусів скручування листя винограду та коротковузля базувалася на щепленні на сорти-індикатори. Однак цей метод потребує декількох років дослідження. Необхідною стає діагностика за допомогою сучасних швидких серологічних та молекулярно-генетичних методів аналізу. Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяє в короткий термін визначити наявність нукліноутворювальних бактерій у дозі, корінні винограду, ґрунті, інфікованість куців винограду фітопатогенними вірусами [12, 15, 17, 20]. Для виявлення вірусних інфекцій винограду ефективно застосовується метод імуноферментного аналізу (ІФА), який також є високочутливим і специфічним методом діагностики [2, 3, 9, 25].

Метою даної роботи було дослідження деяких сортів винограду на інфікованість збудником бактеріального раку і наявність вірусних захворювань скручування листя і коротковузля.

Матеріали і методи. На інфікованість пухлиноутворювальними агробактеріями впродовж 2003 р. досліджували клони підщених сортів *V. berlandieri* × *V. riparia* Кобера 5ББ, *V. berlandieri* × *V. riparia* СО₄, *V. riparia* × *V. rupestris* 101-14 і *V. riparia* × *V. rupestris* 3309 (ОАО “Украгро” Овідіопольський р-н, Одеська обл.), клони прищенимого сорту Каберне Совінйон (господарства Одеської області), рядовий садивний матеріал прищених сортів Страшенський, Восторг (господарства Херсонської обл.), Цитронний Магарача (АР Крим). Вищевказані прищени сорти винограду також досліджували на наявність таких вірусів, як вірус скручування листя винограду (1-й та 3-й серотипи) і вірус коротковузля винограду.

Виділення збудника бактеріального раку зі здерев'янілої лози винограду проводили згідно з методом Lehoczky [14] з висівом на напівселективне середовище Рой і Сасера (RSM) [22]. Після інкубації впродовж 5–7 днів при 25 °С колонії пересівали на скошений картопляний агар. ПЛР проводили з ДНК, виділеними з одnodобових культур шляхом теплового лізису бактеріальної суспензії [12, 23]. Загальний об'єм реакційної суміші для проведення ПЛР становив 20 мкл, об'єм зразка – 5 мкл. У реакційну суміш вносили по 10 нмоль кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксирибонуклеозидтрифосфату, 2 Од Таq-полімерази, 2 мМ MgSO₄, 4 мкл буфера для проведення ПЛР (5×) (усі реагенти фірми “АмпліСенс”, Росія). Використовували праймери до послідовності *ipt* Тіплазміди [12].

Позитивним контролем слугував патогенний штам *A. tumefaciens* FA2, люб'язно наданий доктором Т.Д. Вурґ (Корнелльський університет, США). Негативним контролем – деіонізована вода.

Ампліфікацію проводили згідно з Naas et al. [12], збільшивши час початкової денатурації до 3 хв [5], а температуру відпаду у процесі добору оптимальних параметрів ПЛР – до 52 °С.

Для тестування кутів клонів винограду на наявність GLRaV-1 та GLRaV-3 у серпні-вересні відбирали нижче листя рослини, а для виявлення GFLV – верхнє листя. З настанням холодів виділення вірусу проводили із здерев'янілих пагонів. Зразки транспортували в лабораторію і досліджували в той самий день або зберігали при –20 °С протягом декількох місяців. Зразки для проведення ПЛР готували згідно з Rowhani et al. [21].

Реакційна суміш для проведення зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) обсягом 25 мкл містила деіонізовану воду, 10× ПЛР буфер (500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl, pH 9,0), сахарозу (20 %) і крезоловий червоний, 2 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатів (dNTP), 0,1 М дитіотреїтолу (ДТТ), 10 нмоль кожного праймера, 1,25 Од Таq-полімерази (“АмпліСенс”), 8 Од ревертази (“АмпліСенс”, Росія), 1,5 мМ MgSO₄ [21]. Для тестування на присутність GFLV концентрація магнію була оптимізована і становила 1,3 мМ. Використовували такі пари праймерів: CPV і CPC (GLRaV-1), C 547 і H 229 (GLRaV-3), oligoC1 і oligoV1 (GFLV) [17–19].

У реакційну суміш вносили по 2 мкл підготовленого зразка.

Як позитивний контроль використовували інфікований вірусом коротковузля і скручування листя матеріал винограду, люб'язно наданий доктором D. Boscia (Барійський університет, Італія). Як негативний контроль – деіонізовану воду.

Зворотню транскрипцію проводили у термостаті при 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 сягав 7 хв (A. Rowhani, особисте повідомлення). Для GLRaV-1 у ході дослідження температура відпаду була зменшена до 53 °С, а для GFLV збільшена до 61 °С.

Реакцію проводили у програмувальному термостаті “Терцик” фірми “ДНК-Технологія” (Росія). Електрофорез здійснювали в 1,5 %-му агарозному гелі. Бромистий етидій для візуалізації продуктів ПЛР входив

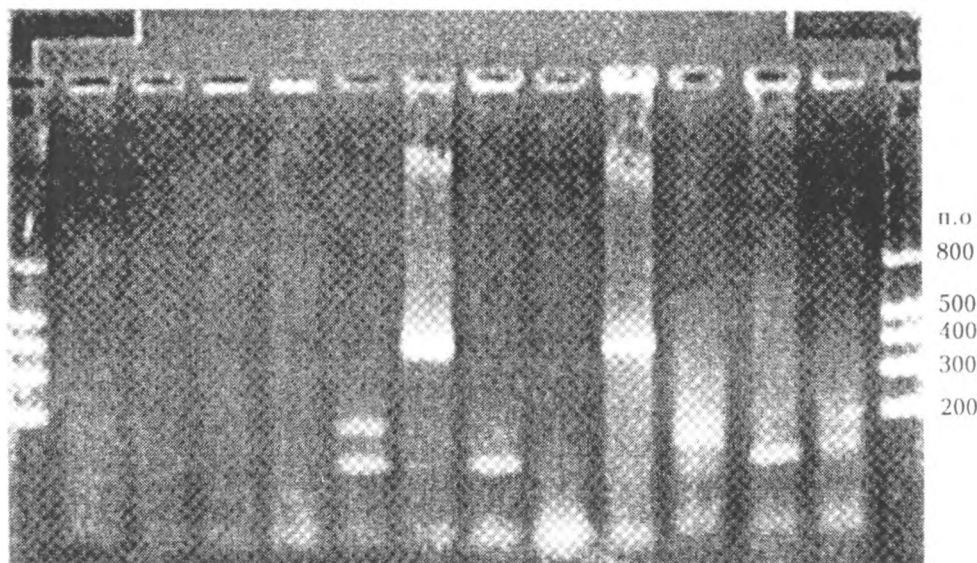


Рис. 1. Електрофорез продуктів ПЛР з праймерами *ipt* в агарозному гелі. М – маркер молекулярної ваги; 2 – негативний контроль; 7 – позитивний контроль штамом *Agrobacterium tumefaciens* FA2; 10 – позитивний зразок соргу Восторг; 3 – 6, 8, 9, 11, 12, 13 – негативні зразки сортів Восторг та Страшенський

до складу трис-боратного буфера для електрофорезу (“АмпліСенс”, Росія). Гель фотографували за допомогою відеосистеми “Samsung” в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 312 нм). Для оцінки молекулярної ваги ампліфікованих фрагментів застосовували маркер 800 – 200 п. о. (“АмпліСенс”, Росія).

Для ІФА використовували діагностичні набори фірми “Agritest” (Італія). ІФА проводили згідно з рекомендаціями цієї фірми. Для виявлення GLRaV-1, GLRaV-3 та GFLV застосовували “сендвіч”-метод ІФА.

Результати та їх обговорення. За даними дослідників, латентне інфікування пухлиноутворювальними агробактеріями можливе на всіх підщепних сортах [4]. У ході дослідження нами був встановлений відсоток кущів з латентною інфекцією серед клонів підщепних сортів з виногради Одеської обл. Усього було протестовано 84 кущі клонів винограду. Сорти *V. berlandieri* × *V. riparia* CO₄, *V. riparia* × *V. rupestris* 101-14 і *V. riparia* × *V. rupestris* 3309 виявилися вільними від збудника, у той час як *V. berlandieri* × *V. riparia* Кобера 5ББ у 6,2 % випадків був уражений бактеріальним раком (табл. 1).

Таблиця 1

Інфікованість підщепних сортів винограду *Agrobacterium vitis*

Сорт	Відсоток інфікованих кущів, %
<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> CO ₄	0
<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i> 101-14	0
<i>V. riparia</i> × <i>V. rupestris</i> 3309	0
<i>V. berlandieri</i> × <i>V. riparia</i> Кобера 5ББ	6,2

Аналізували кущі клонів прищепного сорту Каберне Совіньйон, рядовий садивний матеріал прищепних сортів Страшенський, Восторг (рис. 1), Цитронний Магарача. Усього було протестовано 180 кущів винограду прищепних сортів.

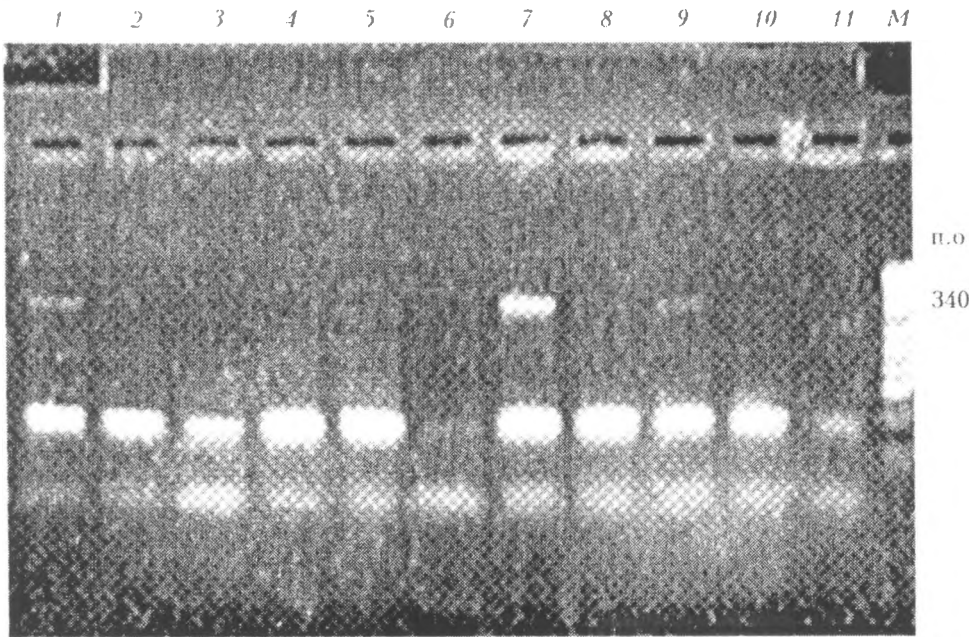


Рис. 2. Електрофорез продуктів ПЛР з праймерами С547 і П229 в агарозному гелі. М – маркер молекулярної ваги; 6 – негативний контроль; 7 – позитивний контроль GLRaV-3; 1, 9 – позитивні зразки сорту Цитронний Магарача; 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11 – негативні зразки сорту Цитронний Магарача

Найбільш ураженими бактеріальним раком серед прищепних сортів виявилися Каберне Совінйон і Восторг (табл. 2).

Слід відмітити той факт, що інфікованими бактеріальним раком виявляються не тільки рядовий садивний матеріал, а й клони винограду. До системи сертифікації садивного матеріалу, прийнятої Європейським співтовариством, не входить тестування рослини на наявність збудника бактеріального раку винограду. Як наслідок, садивний матеріал може містити *A. vitis*. Симптоми захворювання проявляються на саджанцях з латентною інфекцією вже на 2 - 3-ій рік після посадки. З ураженим садивним матеріалом збудник бактеріального раку потрапляє до ґрунту, її інфікована ділянка може довгий час залишатися резервуаром *A. vitis* [13].

Одержані результати вказують на необхідність включення *A. vitis* у перелік збудників, тестування на наявність яких сертифікованого садивного матеріалу є обов'язковим.

Таблиця 2

Інфікованість прищепних сортів винограду *Agrobacterium vitis* і деякими фітовірусами

Сорт	Матеріал	Інфікованість кущів, %			
		<i>A. vitis</i>	GLRaV 1	GLRaV-3	GFLV
Каберне Совінйон	Клоновий	21,4	0,0	0,0	0,0
Страшенський	Рядовий	10,0	0,0	10,0	10,0
Восторг	"	25,0	5,0	5,0	0,0
Цитронний Магарача	"	7,0	0,0	10,0	0,0

Сорти Каберне Совіньйон, Страшенський, Восторг та Цитронний Магарача досліджували на наявність латентної інфікованості вірусами GLRaV-1, GLRaV-3 і GFLV. Виявилось, що кущі рядового матеріалу сортів Восторг, Цитронний Магарача та Страшенський містили збудник скручування листя винограду, причому сорти Цитронний Магарача та Страшенський були інфіковані вірусом скручування листя 3-го серотипу (рис. 2), а сорт Восторг — 1-м та 3-м серотипами вірусу. Зразки сорту Страшенський також містили збудник коротковузля винограду, тоді як клоновий матеріал сорту Каберне Совіньйон виявився вільним від збудників даних вірусних інфекцій. Одержані результати свідчать про важливість сертифікації садивного матеріалу винограду, оскільки кущі клонів, що пройшли тестування на наявність вірусних інфекцій, не містять збудників GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV, а рядовий матеріал виявився інфікованим.

Подальші дослідження у даному напрямку дозволять зробити висновки про поширеність бактеріального раку, скручування листя і коротковузля на виноградниках. Кущі клонів, які були закуплені за кордоном, необхідно обов'язково тестувати на наявність збудника бактеріального раку винограду.

Висловлюємо щирі подяку доктору Т.Д. Бурр (США) і доктору D. Boscia (Італія) за надані позитивні контролю, доктору А. Roghani (США) за допомогу з методикою ЗТ ПЛР, докт. біол. н. С.С. Мадюти і канд. біол. н. Г.Д. Телегесву (Україна) за допомогу в освоєнні методики ПЛР.

Б.П. Милкус, Л.А. Кошун, Н.Д. Журько, Н.В. Лиманская
Одеський національний університет

ТЕСТИРОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА И ВИРУСОВ КОРТОКВОЗЛИЯ И СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ

Резюме

Некоторые подвойные и привойные сорта винограда, культивируемые в Украине, исследовали на зараженность опухолеобразующими агробактериями, вирусом коротковузлия винограда, вирусами скручивания листьев винограда 1-го и 3-го серотипов при помощи методов иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции. В ходе исследования параметры полимеразной цепной реакции были модифицированы. Показано, что инфицированными бактериальным раком являются не только рядовой посадочный материал, но и сертифицированные клоны винограда. Клоновый материал оказался свободным от вирусов коротковузлия и скручивания листьев винограда, в то время как рядовой посадочный материал был инфицирован фитовирусами. Полученные результаты указывают на необходимость включения *Agrobacterium vitis* в список возбудителей, тестирование на присутствие которых посадочного материала является обязательным.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Agrobacterium vitis*, вирус коротковузлия винограда, вирус скручивания листьев винограда, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ.

TESTING OF SOME GRAPEVINE CULTIVARS
FOR THE PRESENCE OF CROWN GALL DISEASE AGENT
AND FANLEAF AND LEAFROLL VIRUSES

S u m m a r y

Some rootstocks and scion cultivars grown in Ukraine have been tested for the presence of tumorigenic agrobacteria, grapevine fanleaf and grapevine leafroll viruses of the 1st and 3rd serotypes by polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. The conditions of polymerase chain reaction were modified in the course of investigations. It was shown that the certified material as well as regular planting material may be infected by the agent of crown gall disease. Certified grapevine material was free from grapevine fanleaf and grapevine leafroll viruses; at the same time the regular planting material was infected by both viruses. Our data indicate the necessity of including *Agrobacterium vitis* in the list of pathogens that should be tested in the process of certified planting material production.

K e y w o r d s. *Agrobacterium vitis*, grapevine fanleaf virus, grapevine leafroll virus, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: B.N. Milkus, Odessa National University, 2 Dvoryanskaya St., Odessa, 65026, Ukraine.

1. Вердеревская Т.Д., Маринеску В.Г. Вирусные и микоплазмные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штиинца, 1985. С. 242–242.
2. Гуртова Р.В. Иммунологические исследования в фитовирусологии. М.: Наука, 1985. С. 137–147.
3. Жарыко Н.Д. Применение иммуноферментного анализа для выявления вирусов винограда. Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ "Магарач" – Ялта: ИВиВ "Магарач", 2003. С. 16–18.
4. Леманова Н.Б., Гамина Э.И. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур. Кишинев: Штиинца, 1991. С. 27.
5. Личанская Н.В. Выявление *Agrobacterium vitis* в почве виноградника. Виноградарство и виноделие. Сб. науч. тр. ИВиВ "Магарач". – Ялта: ИВиВ "Магарач", 2003. С. 29–31.
6. Мачини Н. Устойчивость некоторых европейских сортов и подвоев к бактериальному раку. Лозарство и виноарство. 1981. № 1. С. 32.
7. Buri 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. 82. P. 1288–1297.
8. Buri T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management. Annu. Rev. Phytopathol. 1999. 37. P. 53–80.
9. Clark M.F., Bar Joseph M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. Meth. Virol. 1984. N 7. P. 51–85.
10. Esmeñand 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 Dis. 1994. 78. N 11. P. 1087–1090.
11. Ferreira J.H.S., Zyl I.G.H. Susceptibility of grapevine rootstocks to strains of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. S. Afr. J. Enol. Vitic. 1997. N 7. P. 101–104.
12. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Appl. Environ. Microbiol. 1995. 61. N 8. P. 2879–2884.
13. Krini Z., Petit A., Mougel P. et al. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils. Appl. Environ. Microbiol. 2002. 68. N 7. P. 3358–3365.
14. Lehouck J. Further evidences concerning the systemic spreading of *Agrobacterium tumefaciens* in the vascular system of grapevines. Vitis. 1971. 10. P. 215–221.

15. 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 Dis.* 1997. **81**, N 2. P. 222–226.
16. Martelli G.P., Graniti A., Ercolani G.L. Nature and physiological effects of grapevine diseases. *Experientia.* 1986. N 42. P. 933–942.
17. Minafra A., Hadidi A. Sensitive detection of grapevine viruses A, B or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J. Virol. meth.* 1994. N 47. P. 157–188.
18. Minafra A., Grieco F., Gallitelli D., Martelli G.P. Improved PCR procedures for multiple identification of some artichoke and grapevine. *Bull. OEPP-EPPH.* 1995. N 25. P. 283–287.
19. Rožhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. Development of polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf viruses in grapevine tissue. *Phytopathology.* 1993. **83**, N 7. P. 749–753.
20. Rožhani A., Mamingas M.A., Lile I.S. et al. Development of detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology.* 1995. **85**, N 3. P. 347–352.
21. Rožhani A., Biardi V., Johnson R. et al. Simplified sample preparation method and one tube RT-PCR for grapevine viruses. (13th ICVG Conf. Adelaide, 12–17th March, 2000): Absts. Adelaide, 2000. P. 148.
22. Roy M., Sasser M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Phytopathology.* 1983. **73** P. 810.
23. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in bleeding sap after isolation on a semiselective medium. *Vitis.* 2002. **41**, N 1. P. 37–42.
24. Storer E.W., Swartz H.J., Burt T.J. Crown gall formation in a diverse collection of *Vitis* genotypes inoculated with *Agrobacterium vitis*. *Amer. J. Enol. Vitic.* 1997. N 48. P. 26–32.
25. Voller A., Bartlett A., Bidwel D.E. et al. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 1976. N 33. P. 165–167.

Одпечатано 14.05.2004