

ВИЯВЛЕННЯ ЗБУДНИКІВ ПОЧОРНІННЯ ДЕРЕВИНИ І БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ ВІНОГРАДУ НА ПІВДНІ УКРАЇНИ

Л.О. КОНУП, кандидат біологічних наук

Національний науковий центр «Інститут виноградарства і виноробства ім.
В.Є. Таїрова»

Проведено фітосанітарне обстеження враженості деревини винограду почорнінням і збудником бактеріального раку промислових виноградників різних регіонів півдня України. Виявлено та ідентифіковано збудників почорніння деревини і бактеріального раку. Для цього використані методи фітосанітарного обстеження та полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Ключові слова: виноград, фітоплазма, почорніння деревини, бактеріальний рак

Основні параметри якості винограду визначаються багатьма показниками, в тому числі агрокліматичними умовами вирощування, сортами й відсутністю захворювань. Серед хвороб, що вражають виноград, особливе місце посідають грибкові, бактеріальні й фітоплазмові захворювання, які завдають серйозної шкоди виноградарству України. Серед бактеріальних хвороб найбільшу загрозу для європейських та підщепних сортів становить бактеріальний рак, збудником якого є бактерія *Rizobium (Agrobacterium) tumefaciens (vitis)*. *Agrobacterium vitis* – пухлиноутворюючі бактерії, які вражають виноград, - здатні спричинити 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. Чутливість сортів винограду до бактеріального раку різна. Ступінь ураження певного сорту залежить від кліматичної зони культивування винограду [4] .

Природно-кліматичні умови півдня України сприятливі для адаптації збудника хвороби, тому й імовірність розповсюдження її дуже висока.

Складність контролю інфекції є першою причиною того, що бактеріальний рак винограду не входить до загальноприйнятої системи сертифікації, яка діє в країнах Європейської Співки, другою причиною - низькій рівень прояву бактеріального раку в найбільших виноградарських країнах (Італії, Франції, Німеччині), отже – відсутність великих збитків від хвороби.

Останнім часом на виноградниках України виявили дуже небезпечну бактеріальну хворобу, спричинену фітоплазмою, яка поширена в Італії, Франції, Югославії, Німеччині, і на території СНД донині не реєструвалася. Збитки від цієї хвороби дуже значні.

Найшкідливішою і найпоширенішою серед хвороб, що спричиняють фітоплазми в країнах Європи є золотисте пожовтіння винограду [3] та почорніння його деревини [5]. Ці дві хвороби за симптомами дуже схожі, ідентифікацію їх можна провести тільки лабораторними молекулярно-діагностичними методами [2, 7, 6].

Фітоплазмозна інфекція у 2004 році була виявлена на території Одеської області на сорті Шардоне [1], найчутливішому до її збудника. При ідентифікації цієї інфекції встановлено, що вона призводить до почорніння деревини і належить до групи стовбуру.

Діагностика цих небезпечних бактеріозів є важливим завданням запобігання їх розповсюдження. Наші дослідження були спрямовані на розробку швидких і надійних методів діагностики цих хвороб.

Метою досліджень було вивчити поширення фітоплазмозних хвороб і бактеріального раку винограду на промислових виноградниках Одеської, Миколаївської та Херсонської областей півдня України та удосконалити методи їх діагностики і ідентифікації збудників.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили у виноградарських господарствах Одеської, Миколаївської і Херсонської областей. Матеріалом для вивчення було листя винограду та чубуки виноградної лози сортів Каберне Совіньйон і Шардоне.

В роботі використовували метод візуального обстеження кущів винограду на промислових виноградниках щодо наявності в них симптомів фітоплазмової хвороби і бактеріального раку.

Діагностику на латентне враження цими хворобами і ідентифікацію фітоплазм проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Збудник бактеріального раку виділяли на штучне напівселективне середовище Рой і Сассера [9]. Для виявлення патогенних штамів *Agrobacterium vitis* використовували *ipt* – праймери. Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила по 10 pmol кожного з праймерів, 200 мкМ кожного дезоксинуклеозидтрифосфату, 2 U Taq – полімерази (“Амплісенс”, Росія), 2 mM MgSO₄, 4 мкл буфера 5x (“Амплісенс”, Росія), 5 мкл надосадової рідини підготовленого зразка. Відпал здійснювали при 52 °С. Для ампліфікації використовували програмований термоциклер “Терцик” фірми “ДНК - Технологія” (Росія). Позитивним контролем у ПЛР слугував патогенний штам *Agrobacterium tumefaciens* FA2, негативним контролем – деіонізована вода. ПЛР ампліфікацію для ідентифікації фітоплазми проводили з універсальною парою праймерів до різних ділянок геному, специфічною для фітоплазм STOL11f2/r1 і STOL11f3/r2 [8]. Праймери синтезовані фірмою НПФ «Литех», Росія. Реакційна суміш (40 мкл) складалась із 4 мкл буфера 10x для ПЛР; 1,2 мкл 1,6 mM 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 (реактиви фірми «Амплісенс»); 22,8 мкл деіонізованої води і 2 мкл нерозведеної виділеної ДНК фітоплазми.

Для збільшення виходу продукту ПЛР здійснювали дві ампліфікації, оскільки після першої візуально продукт ПЛР не спостерігали [8].

Електрофорез продуктів ПЛР проводили у 1,5 % -вому агарозному гелі. Трисборатний буфер для електрофорезу містив бромід етідію (“Амплісенс”, Росія). За допомогою відеосистеми “*Biosom*” гель фотографували під УФ – випромінюванням (довжина хвилі становила 312 нм). Як маркер молекулярної маси використовували 2100 – 150 пар основ (“Амплісенс”, Росія). Після проведення електрофорезу спостерігали амплікони розміром 427 п.о. для виявлення збудника бактеріального раку і амплікони розміром 825 п.о. для ідентифікації почорніння деревини винограду – *Bois Noir* (BN).

Результати досліджень. Промислові насадження винограду в господарствах Одеської, Миколаївської і Херсонської областей обстежили на наявність симптомів бактеріального раку і фітоплазмових хвороб. У 2010 році провели контроль маточних насаджень та садивного матеріалу виробництва України та Сербії на латентне враження бактеріальним раком, а методом ПЛР-аналізу діагностику на латентну враженість збудником бактеріального раку в саджанцях візуально здорових (таблиця).

Виявлення латентного враження збудником бактеріального раку винограду на промислових виноградниках Одеської, Миколаївської і Херсонської областей, 2010 р.

Сорт винограду	Кількість відібраних зразків, шт.	Кількість уражених зразків, %
Мускат Одеський	100	0
Каберне Совінйон	200	7
Ркацителі	50	2
Шардоне,	100	2
Аркадія	50	0
Орігінал	48	0
Піно чорний	100	0
Мерло	150	5
Аліготе	20	0
Карабурну	170	0
Італія	100	0

Фітоплазмові хвороби було досліджено в чотирьох виноградарських господарствах Одеської області. Встановлено значне збільшення симптоматологічного прояву фітоплазмової інфекції в 2010 році, особливо на чутливих сортах, насамперед, на сорті Шардоне (рисунок).



Висновки

1. На території Одеської, Миколаївської і Херсонської областей виявлено збільшення виноградних кущів хворих на бактеріальний рак і почорніння деревини.
2. Для виявлення і ідентифікації збудників бактеріального раку і почорніння деревини використовували метод ПЛР-діагностики.
3. Встановлено значне поширення фітоплазмової хвороби на сорті Шардоне в виноградарських господарствах Одеської області.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Фитоплазменное заболевание винограда на Украине / Б.Н. Милкус, Л.А. Конуп, И.Д. Жунько, Н.В. Лиманська//”Магарач” Виноградарство и виноделие. – 2004. – № 3. – С.12-14.
2. Detection of chrysanthemum yellows mycoplasma-like organism by dot hybridization and Southern blot analysis//Plant Dis. A. Bertaccini, R.E. Davis, I.-M. Lee et al. – 1990. –Vol. 74. – P. 40-43.
3. Geographical distribution of elm yellows-related phytoplasmas in grapevine Flavescence doree outbreaks in Veneto (Italy)//12th Meeting of ICVG, Lisbon, Portugal, Sept 28–Oct 2. A. Bertaccini, M. Vibio, D. et al. Schaff. – 1997. – P. 57-58.
4. Crown gall of grape: biology of *Agrobacterium vitis* and the development of disease control strategies T.J. Burr, C. Bazzi, S. Süle, L. Otten. // Plant Dis. – 1998. – 82. – P.1288 – 1297.
5. Actual distribution of *Hyalesthes obsoletus* Signoret (Auchenorrhyncha: Cixiidae) in German viticulture and its significance as a vector of Bois noir //IOBC/wprs Bulletin. M. Maixner, H. Darimont. – 2001. – Vol. 24, N 7. – P. 199-202.
6. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of apple proliferation MLO W. Jarausch, C. Saillard, F. Dosba, J.M. Bove //Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – Vol. 60. – P. 2916–2923.
7. Characterization of isolates of Vergilbungskrankheit-phytoplasma by rflp-analysis and their association with grapevine, herbaceous host plants and vectors M. Langer, H. Darimont, M. Maixner //14th Meeting of ICVG, Locorotondo (Bari), Italy, September 12–17, 2003. – 2003. – P.71.
8. First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera*, cv Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine B. Milkus, D. Clair, S. Idir, et al.//New Disease Reports. –2005. – Vol. – P. 7.

9. Roy M. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3// Phytopathology. M. Roy, M. Sasser – 1983. – V. 73. – P. 810.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПОЧЕРНЕНИЯ ДРЕВЕСИНЫ И БАКТЕРИАЛЬНОГО РАКА ВИНОГРАДА НА ЮГЕ УКРАИНЫ

Конуп Л.А.

Проведено фитосанитарное обследование заражения почернением древесины винограда и возбудителем бактериального рака промышленных виноградников разных регионов юга Украины. Было выявлено и идентифицировано возбудителей почернения древесины и бактериального рака винограда. Для этого использовали методы фитосанитарного обследования и полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Ключевые слова: виноград, фитоплазма, почернение древесины, бактериальный рак

IDENTIFICATION OF PATHOGENS BLACKENING WOOD AND CROWN GALL OF GRAPES IN THE SOUTH UKRAINY

Konup L.A.

Phytopsanitary inspection conducted contamination of grapes and blackening the wood crown gall pathogen commercial vineyards in different regions of south of Ukraine. Were detected and identified by pathogens blackening the wood and crown gall of grapes. For this study used the methods of pest and polymerase chain reaction (PCR).

Key words: grapes, phytoplasma, blackening wood, crown gall

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Конуп Людмила Олександрівна, кандидат біологічних наук, завідувачка лабораторією вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства ім.. В. Є. Таїрова».

Адреса: 65496, Одеська обл., Овідіопольський р-н, смт Таїрове, вул. 40-річчя Перемоги, 27.

0964818635 м.т.

(048)7403645 р.т.

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
“ІНСТИТУТ ВІНОГРАДАРСТВА І
ВІНОРОБСТВА ІМ. В.Є. ТАІРОВА”

Вул. 40-річчя Перемоги, 27
смт Таїрове, м. Одеса,
65496, Україна
тел/факс: +38(048) 740-36-76
тел. +38(048) 769-05-44
E-mail: iviv@te.net.ua
iviv_nnc@ukr.net



NATIONAL ACADEMY
OF AGRARIAN SCIENCES OF UKRAINE
NATIONAL SCIENTIFIC CENTRE
“INSTITUTE OF VITICULTURE AND WINE-
MAKING NAMED AFTER V.YE. TAIROV”

27, 40 let Pobedy str.,
Tairovo, Odessa,
65496, Ukraine
Tel./Fax: +38 (048) 740 -36-76
Tel. +38(048) 769 -05-44
E-mail: iviv@te.net.ua
iviv_nnc@ukr.net

Вих. _____
” ___ ” _____ 2011р.

Відповідальному редактору
електронного журналу
«Наукові доповіді Національного університету
біоресурсів і природокористування України»
академіку НАНУ та НААН України,
д.б.н., професору Д.О.Мельничуку

Просимо опублікувати в Вашому журналі статтю Конуп Л.О. «Виявлення збудників
почорніння деревини і бактеріального раку винограду на півдні України»

З повагою,

Директор

В.В. Власов

Вик. Конуп Л.О.
(048)740-36-45

