

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 632.3

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСОВ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА 1 И 3 (GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUSES-1 И -3) НА ТЕРРИТОРИИ КРЫМА

Е.В. Поротикова¹, В.И. Рисованная², Я.А. Волков², Ю.Д. Дмитренко¹,
В.А. Володин², С.М. Гориславец², Е.П. Странишевская², А.А. Аграновский³,
А.М. Камионская¹, С.В. Виноградова^{1,*}

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”, РАН;
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2;

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “МАГАРАЧ”, РАН;
Россия, 298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, д. 31;

³ кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: coatprotein@bk.ru

Скручивание листьев винограда, вызываемое комплексом вирусов, является одним из самых распространенных и вредоносных вирусных заболеваний этой культуры. Для изучения распространенности вирусов скручивания листьев винограда 1 и 3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 — GLRaV-1 и grapevine leafroll-associated viruses-3 — GLRaV-3) было проведено обследование виноградных насаждений в шести районах Крыма в осенний и весенний период 2015 г. Отобрано 689 образцов с симптомами вирусной инфекции. Диагностику проводили методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции, продукты реакции секвенировали. GLRaV-1 и GLRaV-3 были обнаружены в 34 (4,9%) и 37 (5,4%) образцах соответственно. В обследованных хозяйствах Севастопольского и Бахчисарайского района GLRaV-1 и GLRaV-3 обнаружены не были.

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, виноград, вирусные заболевания винограда, вирус скручивания листьев винограда 1, вирус скручивания листьев винограда 3, виноградники Крыма.

Виноград (*Vitis vinifera* L.) — одна из наиболее значимых культур южных областей России, высокая урожайность которой зависит от качественного посадочного материала и фитосанитарного состояния насаждений. Вирусные патогены являются серьезной проблемой для возделывания виноградников во всем мире.

В настоящее время обнаружено около 70 вирусов, поражающих виноград [1]. Скручивание его листьев является одним из наиболее вредоносных и широко распространенных вирусных заболеваний виноградной лозы, которое приводит к снижению урожайности на 15–40% [1]. На инфицированных растениях формируются мелкие, плохо вызревающие ягоды. Содержание простых углеводов в соке ягод снижается на 5–26%, ухудшаются окраска и внешний вид гроздей.

Скручивание листьев виноградной лозы вызывается несколькими вирусами семейства Closteroviridae, часто совместно поражающими растения [4]. Характерным симптомом заболевания является скручивание листьев краями вниз. Наиболее сильно симптомы выражены на темнойгодных сортах винограда, у которых также наблюдается раннее покраснение листовых пластинок вдоль жилок листа. У светлогонных сортов заболевание проявляется в виде слабого хлороза [2, 4–7]. Симптомы

значительно варьируют в зависимости от вида и изолята вируса, сорта винограда, погодных условий. Кроме того, инфекция может быть бессимптомной [5].

Основные возбудители болезни скручивания листьев — вирусы скручивания листьев винограда-1 и -3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 — GLRaV-1 и grapevine leafroll-associated viruses-3 — GLRaV-3) рода *Ampelovirus*. Симптомы поражения GLRaV-1 и GLRaV-3 незначительно различаются между собой, однако для GLRaV-3 характерно более сильное изменение окраски листьев, особенно для сортов с окрашенными ягодами [4, 8, 9]. GLRaV-1 и GLRaV-3 распространяются при прививках винограда и переносятся полуперсистентно мучнистыми червецами семейства Pseudococcidae и ложнощитовками семейства Coccidae [10].

Присутствие GLRaV-1 и GLRaV-3 было отмечено во всех основных винодельческих регионах Европы, Северной и Южной Америки, Африки, Азии и Океании [12]. Данные по распространению скручивания листьев винограда в винодельческих зонах России практически отсутствуют. В литературе встречаются лишь единичные упоминания обследования двух районов Крыма [12]. Целью данной работы было изучить распространение GLRaV-1 и GLRaV-3 на виноградниках Крыма.

Материалы и методы

Обследования виноградников и отбор образцов растений с симптомами вирусных заболеваний проводили в осенний и весенний период 2015 г. В зависимости от размера участка и частоты встречаемости симптомов обследовали от 25% до 33% растений винограда (осматривали каждый четвертый и каждый третий ряды, соответственно). На массивах виноградников одного сорта и года посадки площадью свыше 10 га — обследовали до 5–10% растений. Осмотр растений проводили по диагонали виноградника, при этом исследовали все кусты в рядах с обеих сторон по всей длине маршрута, а также растения в крайних рядах. Пораженные растения выявляли визуально.

Из отобранных образцов выделяли суммарную РНК по методике, описанной Ротт и Йелкман [13]. Качество выделения контролировали методом электрофоретического анализа. РНК использовали для синтеза кДНК обратной транскриптазой RevertAid H Minus (Thermo Scientific™, каталожный номер EP0451) по протоколу производителя. Полученную кДНК добавляли в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами. ПЦР проводили с использованием реактивов Thermo Scientific™ (каталожный номер EP0405) на амплификаторе Gene Amp 9700 PCR System, Applied Biosystems. Условия амплификации были следующими: 95°C — 2 мин, 95°C — 30 с, 56°C (или 61°C) — 45 с, 72°C — 60 с, 72°C — 2 мин. Для анализа наличия GLRaV-1 использовали праймеры CPV 5'-ATGGCTAGCGTTATATCTCAAA-3' и CPC 5'-CCGGTTGGTAATACTACCGAAA-3', температура отжига праймеров 61°C [14]. Для анализа наличия GLRaV-3 использовали специфические праймеры 547F 5'-ATTAACCTTGACGGATGGCACGC-3' и H229 5'-ATAAGCATTCGGGATGGACC-3', температура отжига праймеров 56°C [15]. Каждый образец суммарной РНК анализировали индивидуально. Продукты обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) разделяли в 1%-ном агарозном геле. Продукты амплификации выделяли из агарозного геля с использованием набора Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», каталожный номер BC022) по протоколу производителя. ДНК секвенировали

с использованием реактивов Big Dye Terminator v.3.1 chemistry на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 согласно инструкциям производителя.

Результаты и обсуждение

Обследование виноградников на наличие вирусов скручивания проводили в одиннадцати хозяйствах шести виноградных зон Крыма: Алуштинского, Ялтинского, Севастопольского, Бахчисарайского, Судакского и Симферопольского районов.

В 2015 г. наблюдались оптимальные погодные условия для распространения GLRaV-1 и GLRaV-3 переносчиками, мучнистыми червецами и ложнощитовками, наличие которых было отмечено на виноградниках обследованных территорий.

На виноградных насаждениях Крыма в первой половине лета 2015 г. обнаруживали растения со слабо деформированными и гофрированными листовыми пластинками. Слабое скручивание листьев и покраснение в этот период проявлялись на нижних листьях единичных растений. Характерные симптомы скручивания листьев винограда наблюдали во второй половине лета 2015 г., при этом окраска и размер ягод визуально не отличались от таковых у бессимптомных растений. Угнетение роста кустов, как правило, не наблюдали. К концу вегетации было отмечено увеличение покраснения листьев. В молодых насаждениях растения с симптомами вирусной инфекции были распределены по всей территории участка. В насаждениях старше 10 лет пораженные растения встречались одиночно или группами по 2–6 лоз, при этом на старых побегах и на участках виноградников, испытывавших недостаток воды, симптомы скручивания проявлялись наиболее интенсивно.

По результатам проведенных обследований было отобрано 689 образцов винограда с симптомами вирусных заболеваний. Каждый образец анализировали на наличие GLRaV-1 и GLRaV-3. Фрагмент электрофореграммы представлен на рис. 1. В результате секвенирования продуктов ПЦР и сравнения с последовательностями, имеющимися в GenBank [16], было подтверждено наличие GLRaV-1 и GLRaV-3 в исследуемых образцах.

GLRaV-1 выявлен в 34 образцах, что составило 4,9% от общего количества растений с симптомами

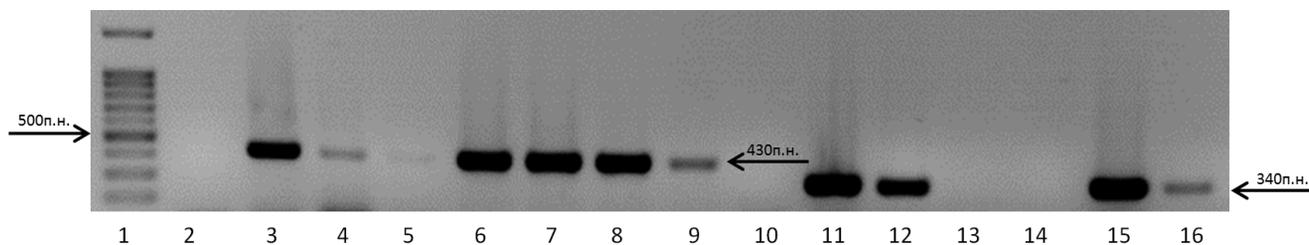


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к GLRaV-1 (дорожки 2–10) и GLRaV-3 (дорожки 11–16): 1 — маркер молекулярной массы (100 bp DNA Ladder Mix, Евроген); 2, 13 — ОТ-ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы (отрицательный контроль); 10, 14 — ОТ-ПЦР с суммарной РНК, выделенной из здоровых растений; 3–9, 11, 12, 15, 16 — ОТ-ПЦР с суммарной РНК, выделенной из образцов листьев винограда с симптомами вирусного заболевания

вирусной инфекции. Присутствие GLRaV-3 было подтверждено в 37 образцах (5,4%). Смешанной инфекции GLRaV-1 и GLRaV-3 в индивидуальных образцах обнаружено не было. Распространение вирусов скручивания по отдельным хозяйствам представлено на рис. 2.

GLRaV-1 был обнаружен в хозяйствах Судакского, Алуштинского и Ялтинского районов, при этом максимальное распространение было отмечено в хозяйствах Ялтинского района (9,6% от общего количества отобранных образцов). В хозяйствах Севастопольского, Симферопольского и Бахчисарайского районов GLRaV-1 не выявлен.

GLRaV-3 был обнаружен в хозяйствах Судакского, Алуштинского, Ялтинского и Симферопольского районов, наибольшее распространение вируса отмечено в хозяйствах Ялтинского района (9,6%). В обследованных хозяйствах Севастопольского и Бахчисарайского районов GLRaV-3 не обнаружен.

Полученные нами данные подтверждают опубликованную ранее предварительную информацию о присутствии GLRaV-1 и GLRaV-3 в хозяйствах Крыма [12]. На основании результатов полевых обследований и лабораторной идентификации можно рекомендовать фитосанитарные меры (выбраковка растений с симптомами заболевания скручивания листьев) и методы биологического контроля (применение инсектицидов против насекомых-векторов) для снижения заболеваемости растений винограда в хозяйствах Крыма. Дальнейшие исследования

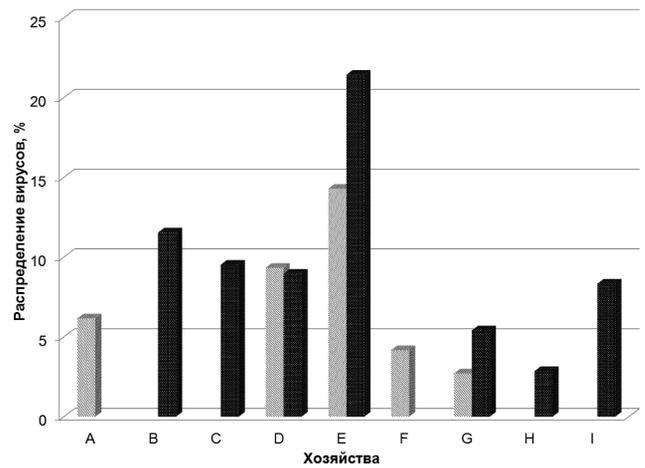


Рис. 2. Распространение GLRaV-1 (светлые столбцы) и GLRaV-3 (темные столбцы) в виноградарских хозяйствах Крыма в 2015 г.: хозяйства А, В, С - Алуштинский район; хозяйства D, Е - Ялтинский район; хозяйства F, G, H - Судакский район; хозяйство I - Симферопольский район

будут направлены на идентификацию других потенциальных возбудителей заболевания скручивания листьев винограда в Крыму (таких, как GLRaV-2, -4, -5, -6 и -7).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (субсидия № 14.604.21.0145), уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0145.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martelli G. P. Grapevine-infecting viruses // Eur. J. Plant Pathol. 2014. Vol. 96. N 1. Suppl. P. 7–8.
- Jooste A., Molenaar N., Maree H. J., Bester R., Morey L., De Koker W. C., Burger J. T. Identification and distribution of multiple virus infections in grapevine leafroll diseased vineyards // Eur. J. Plant Pathol. 2015. Vol. 142. N 2. P. 127–144.
- Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Gugerli P., Rowhani A. Genome organization, serology and phylogeny of grapevine-leafroll associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications // Virus Res. 2010. Vol. 163. N 1. P. 120–128.
- Martelli G.P. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO, 1993. 263 p.
- Rowhani A., Uyemoto J., Deborah A. Golino D. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll-associated viruses // Plant Dis. 1997. Vol. 81. N 7. P. 799–801.
- Krake L.R. Characterization of grapevine leafroll disease by symptomatology // Australian and New Zealand Wine Industry Journal. 1993. Vol. 8. N 1. P. 40–44.
- Hu J.S., Gonsalves D., Teliz D. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease // J. Phytopathol. 1990. Vol. 128. N 1. P. 1–14.
- Volpe M.L., Talquenca S.G., Engel E.A., Gracia O. Incidence of grapevine leafroll associated viruses -1, -2, and -3 in mendoza vineyards // Trop. Plant Pathol. 2010. Vol. 35. N 6. P. 377–380.
- Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. Control of viruses infecting grapevine // Adv. Virus Res. 2015. Vol. 91. P. 175–227.

- Haidar M.M., Diglaro M., Houry W., Savino V. Viruses and virus diseases of grapevine in Lebanon // EPPO Bull. 1996. Vol. 26. N 1. P. 147–153.
- Maree H. J., Almeida R.P. Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolia V.V., Fuchs M.F., Golino D.A., Jooste A.E., Martelli G.P., Naidu R.A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J.T. Grapevine leafroll-associated virus 3 // Front Microbiol. 2013. Vol. 4. N 82. P. 1–21.
- Zhun'ko I.D., Limanska N.V., Milkus B.N. The spread of grapevine viruses on the south Ukraine // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2008. № 51. P. 56–57.
- Rott M.E, Jelkmann W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry, adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol // Eur. J. Plant Pathol. 2001. Vol. 107. N 4. P. 411–420.
- Жунько И.Д. Вирусы-возбудители болезней винограда на Юге Украины (диагностика и распространение): Автореф. дис. ... канд. наук. Одесса, 2006. 161 с.
- 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. Methods. 1994. Vol. 47. N 1–2. P. 175–188.
- Официальный сайт Национального центра биотехнологической информации США [Электронный ресурс]. 2016. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 18.03.2016).

OCCURRENCE OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUSES-1 AND -3 IN CRIMEA

E.V. Porotikova¹, V.I. Risovannaya², Y.A. Volkov², U.D. Dmitrenko¹, V.A. Volodin², S.M. Gorislavets², E.P. Stranisheskaya², A.A. Agranovsky³, A.M. Kamionskaya¹, S.V. Vinogradova^{1,}*

¹ *Research Center of Biotechnology, RAS, 33-2 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russia;*

² *All-Russian National Research Institute for Viticulture and Wine-making "Magarach", 31 Kirov Ul., Yalta, Republic of the Crimea, 298600, Russia;*

³ *Department of Virology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1-12 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia*

**e-mail: coatprotein@bk.ru*

Grapevine leafroll is one of the most widespread and harmful diseases of grapevine. To investigate the occurrence of grapevine leafroll-associated viruses-1 и 3, the survey of vineyards has been conducted in 2015 in six regions of Crimea. Total of 689 leaf samples with virus symptoms were collected. GLRaV-1 and GLRaV-3 were analysed by RT-PCR with the specific primers, followed by sequencing of the PCR products. GLRaV-1 and GLRaV-3 were detected in 34 (4.9%) and 37 (5.4%) of the samples, respectively. Vineyards in Simferopol, Bahchisaray and Sevastopol regions were found to be free of GLRaV-1 and GLRaV-3.

Key words: *Vitis vinifera, grapevine, grapevine virus pathogens, grapevine leafroll-associated viruses-1, grapevine leafroll-associated viruses-3, Crimea vineyards.*

Сведения об авторах:

Поротикова Елена Владимировна — мл. науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: plantvirus@mail.ru.

Рисованная Валентина Ивановна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. группы молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-018-74-62; e-mail: vrisovan@rambler.ru.

Волков Яков Александрович — к.с.-х.н., науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-039-26-65; e-mail: biohappy@ya.ru.

Дмитренко Юлиана Дмитриевна — лаб. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: dmitrenko_uliana@mail.ru.

Володин Виталий Александрович — аспирант, мл. науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-798-82-54; e-mail: vldinvitalja@rambler.ru.

Гориславец Светлана Михайловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований, Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-923-11-94; e-mail: goricvet_2@rambler.ru.

Странишевская Елена Павловна — д.с.-х.н., нач. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-768-63-28; e-mail: stellar1@rambler.ru.

Аграновский Алексей Анатольевич — докт. биол. наук, зав. лаб. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-63; e-mail: aaa@genebee.msu.su.

Камионская Анастасия Михайловна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: akatio@biengi.ac.ru.

Виноградова Светлана Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: coatprotein@bk.ru.