

ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ СКРУЧУВАННЯ ЛИСТЯ ВИНОГРАДУ І ПОШИРЕННЯ ЙОГО НА ВИНОГРАДНИКАХ ПІВДНЯ УКРАЇНИ

А. І. КОНУП, науковий співробітник

В. Л. ЧИСТЯКОВА, старший науковий співробітник

Н. І. НІКОЛАЄВА, молодший науковий співробітник

Л. О. КОНУП, кандидат біологічних наук

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

E-mail: lkmicrobiol@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.01.008>

Анотація. До шкочочинних вірусів виноградних рослин відноється вірус скручування листя винограду. Встановлено 9 серотипів цього вірусу. Найбільш розповсюдженими є фізіологічно споріднені 1-й і 3-й серотипи. Поширення хвороби, збудником якої є вірус скручування листя, відбувається з зараженням садивним матеріалом. Тому необхідна своєчасна точна діагностика хвороби і ідентифікація її збудника. Метою дослідження було виявлення і ідентифікація вірусу скручування листя винограду різних серотипів на виноградниках півдня України. Для досягнення мети були поставлені завдання: дослідити ступінь

ураженості виноградників вірусом скручування листя; провести серологічну і молекулярно-біологічну діагностику для ідентифікації вірусу і порівняти результати дослідження цими методами. Для виконання цієї роботи використовували методи: ІФА (імуноферментний аналіз), класична ЗТ-ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією) і ЗТ-ПЛР у режимі реального часу. В результаті дослідження виявлено вірус скручування листя винограду 1-го і 3-го серотипів на виноградниках півдня України

Ключові слова: вірус скручування листя винограду, ІФА, ЗТ-ПЛР, виноградники

Актуальність. Хвороби виноградних рослин, що викликаються вірусами часто є хронічними, тому в результаті використання заражених куців при виробництві садивного матеріалу відбувається подальше поширення цих хвороб [1, с.1-165]. Крім садивного матеріалу вітчизняного виробництва останнім часом на

територію України завозиться багато саджанців закордонних виробників, а саме з Австрії, Сербії, Франції, Італії, в тому числі і хворих на вірусні і бактеріальні хвороби.

Вірус скручування листя винограду – *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus (GLRaV)* згідно з інформацією *International Council for the study of Virus and Virus-like*

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

Diseases of Grapevine (ICVG) має дев'ять різних серотипів – *GLRaV-1*, *GLRaV-2*, *GLRaV-3*, *GLRaV-4*, *GLRaV-5*, *GLRaV-6*, *GLRaV-7*, *GLRaV-8*, *GLRaV-9* [2, с. 13–31]. Серотипи цього вірусу відносяться до родів *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Velarivirus*, родини *Closteroviridae*, [2, с. 13-31].

Вперше інформація про ураження виноградних рослин невідомою хворобою з симптомами скручування листя з'явилися в німецькій літературі в 19-му столітті, було встановлено, що збудником цієї хвороби є вірус [3, с. 23-28]. Хвороба поширена в США, Європі, Південній Африці, Австралії, Новій Зеландії, Мексиці, Південній Америці, скрізь, де вирощують виноград на західноєвропейських підщепах [3, с. 6-17]. Класифікація серотипів вірусу скручування листя винограду ґрунтується на відмінностях у розмірі вірусних частинок і молекулярної ваги капсидного білка [4, с. 283–289].

Характерними симптомами вірусної хвороби є скручування листя, які приймають форму трикутника і в залежності від сорту змінюють колір від зеленого до жовтого у білоягідних сортів винограду і від зеленого до червоного у червоноягідних сортів. При цьому цукор в ягодах знижується, а кущі виноградних рослин слабнуть і згодом гинуть, що призводить до суттєвих економічних збитків.

Актуальність роботи була зумовлена, насамперед, необхідністю проведення діагностики вірусної хвороби винограду, що викликаються вірусом скручування листя винограду, ідентифікації різних серотипів цього вірусу методом ІФА і ЗТ-ПЛР та аналізу поширення вірусу на виноградниках півдня України.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Вірусна хвороба скручування листя виявлена в країнах Європи і Америки. Найчастіше ураження сортів винограду сягає 7,5 – 19 %, а на окремих сортах доходить навіть до 90 % [5, с. 212-242]. Поширення хвороби на великі відстані відбувається з садивним матеріалом європейських сортів і особливо – з американськими видами підщеп, більшість з яких є безсимптомними носіями цієї хвороби. Насінням винограду хвороба не передається [6, с. 428–451]. До переносників вірусів скручування листя винограду належать деякі види кокцид та псевдоккокцид [7, с. 139–140].

Прищепні сорти винограду уражаються вірусом скручування листя і хвороба проходить у латентній формі і тому це сприяє розповсюдженню вірусів в зоні прищепного виноградарства. Візуальне обстеження промислових виноградників, а також тестування виноградної лози показало, що вірусна хвороба – скручування листя

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

винограду є найпоширенішою хворобою [2, с. 13–31].

Мета. Ідентифікувати вірус скручування листя і його серотипи. Вивчити поширення скручування листя винограду на виноградниках півдня України.

Методи. Вивчення наявності вірусної хвороби – скручування листя винограду проводили методом фітосанітарного обстеження по симптомам хвороби. Для ідентифікації вірусу скручування листя винограду і його серотипів використовували серологічний метод ІФА (імуноферментний аналіз – ELISA), класичну ЗТ-ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією) і ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією.

Фітосанітарне обстеження виноградників та відбір зразків за зовнішніми симптомами проводили в Одеській, Миколаївській і Херсонській областях з 2016 по 2017 рр. з травня по жовтень. З відібраними зразками проводили випробування в лабораторії. Для виявлення вірусів винограду використовували метод імуноферментного аналізу (ІФА-ELISA). Діагностику вірусів проводили згідно інструкцій до наборів ІФА (Agritest, Італія). У роботі використовували мікропланшети фірми “Falcon” і “Dynatech Microelisa” (США).

Підготовку розчинів імуноглобулінів, кон'югату і субстрату проводили відповідно до інструкції наборів. В якості субстрату використовували н-нітрофенілфосфат. Інкубацію реакційної суміші в мікропланшетах проводили в термостаті – шейкері “Dynatec” (США) по дві години при +37 °С. Склад буферів готували згідно інструкції виробника до тест-наборів Agritest, Італія.

Відібрані рослинні зразки, у кількості 1,0 г гомогенізували з розчином екстракційного буферу у співвідношенні 1:15 (рН = 7,4). Надосадову рідину (200 мкл), вносили в лунки мікропланшет і проводили дослідження згідно інструкції до тест-наборів. Показником ІФА було жовте забарвлення розчину в лунках мікропланшети. На останньому етапі реакцію призупиняли за допомогою 20 % розчину NaOH. Результати ІФА фіксували за допомогою імуноферментного аналізатору “Dynatec MR-600” (США) при оптичній щільності 406 нм.

Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно методики авторів [8, с. 41-48, Adib Rowhani, особисте повідомлення], 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: Na₂CO₃ – 1,59 г/л, NaHCO₃ – 2,93 г/л,

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

2 % PVP-40, 0,2 % BSA, 0,5 г/л Tween-20, 10 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (pH 9,0) і інкубували при 95 °C 10 хв. в термостаті «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія). Після цього зразки витримували в холодильнику 3 години при +4 °C. 2 мкл зразка вносили в 23 мкл реакційної суміші ($\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 11,22 мкл, 10× ПЦР-буфер – 2,5 мкл, сахароза + крезол – 2,5 мкл, 4мМ суміш динуклеотидтрифосфатів – 2,5 мкл (1,76 мМ – 2,84 мкл), DTT– 1,24 мкл, p1 (10 pmol) – 1,25 мкл, p2 (10 pmol) – 1,25 мкл, Taq-полімераза (5 Eg/мкл) – 0,25 мкл, ревертаза (200Eg/мкл) – 0,04 мкл, Mg^{2+} (50mM) – 0,75 мкл), покривали шаром олії для ПЛР і проводили ЗТ-ПЛР. Для класичної ПЛР використовували наступні праймери [9, с. 292-299]: до вірусу скручування листя 1-го серотипу (GLRaV1):LR1hsp70-417F/ LR1hsp70-737R, розмір амплікону 320 п.н.; до вірусу скручування листя 3-го серотипу (GLRaV3):LC1/F/LC2/R, розмір продукту ампліфікації 546 п.н.

Зворотну транскрипцію проводили в термостаті «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія) при 42 °C протягом 60 хв., або при 52 °C – 30 хв. [8, с. 41-48]. Ампліфікування проводили в програмованому ДНК-ампліфікаторі «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (НПО ДНК-Технологія, Росія), що включала 35 циклів: денатурація – 94 °C/30с, відпалювання праймерів – 56 °C/45с, синтез гену – 72 °C/60с,

заключний синтез ДНК – 72 °C/7 хв [9, с. 292-299]. Виявлення ампліфікатів проводили методом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі (TBE-буфер, бромистий етидій) протягом 40 хв. при силі електричного струму 60 мА. Гель візуалізували і фотографували за допомогою відео системи «Mintron» в ультрафіолетовому випромінюванні (довжина хвилі 312 нм).

ЗТ-ПЛР у режимі реального часу проводили з використанням пар праймерів, флуоресцентно мічених ДНК-зондів з двома мітками (Taqman®), реакційної суміші, в кількості 20 мкл ($\text{H}_2\text{O}_{\text{деіон}}$ – 8,5 мкл, 10× ПЦР-буфер – 2,5 мкл, сахароза + крезол – 2,5 мкл, 4мМ dNTP – 2,5 мкл (1,76 мМ – 2,84 мкл), DTT– 1,24 мкл, p1 (10 pmol) – 0,5 мкл, p2 (10 pmol) – 0,5 мкл, TaqMan® - 0,5 мкл, Taq-полімераза (5 Eg/мкл) – 0,5 мкл, ревертаза (200Eg/мкл) – 0,04 мкл, Mg^{2+} (50mM) – 0,75 мкл) і 5 мкл НКЗ, або ПКЗ, або внутрішній контроль, або досліджуваний зразок (на дно пробірки). 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). Для контролю виділеної РНК

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

використовували внутрішній контроль, синтезований для ампліфікації мРНК із мітохондрій винограду.

Для ідентифікації вірусів ЗТ-ПЛР в режимі реального часу з використовували наступні праймери і мічені зонди (ЗАТ «Синтол, Росія»), згідно [9, с. 292-299]: до вірусу скручування листя 1-го серотипу (*GLRaV1*) праймери, зонди: LR1 HSP70-149 f – AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGA GTGA – прямий; LR1 HSP70-293 r – GTATTGGACTACCTTTTCGGGAAA AT – зворотний; LR1 HSP70-225 p – CAGGTAATAGCGGACTGAGACTG GTGGACA – флуоресцентно мічений ДНК-зонд; до вірусу скручування листя 3-го серотипу (*GLRaV3*): GLRaV-3 56 f – AAGTGCTCTAGTTAAGGTCAGGA GTGA – прямий; GLRaV-3 285 r – GTATTGGACTACCTTTTCGGGAAA AT- зворотний;

GLRaV-3 181p – CAGGTAATAGCGGACTGAGACTG GTGGACA – флуоресцентно мічений ДНК-зонд.

Зворотна транскрипція і ампліфікація включала наступні цикли: при 45° С протягом 35 хв., 95 °С протягом 10 хв. і 40 циклів 95 °С протягом 15 сек. і 60°С протягом 1 хв. Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері *Rotor-*

Gene 6000 (Corbett Research, Австралія). Накопичення флуоресцентного сигналу вимірювали по каналам: FAM/Green (470 нм/510 нм) для ідентифікації вірусів і JOE/Yellow/HEX (530 нм/555 нм) - для сигналу ендogenous внутрішнього контролю. 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. Якщо криві накопичення флуоресцентного сигналу доходили до 36 циклу, тоді результат реакції вважали позитивним, а якщо криві не перетинали лінію межі або перетинали її після 36 циклу, то результат реакції - негативний (St було <36 - позитивний, при >36 – негативний).

Результати. У результаті обстеження виноградних насаджень технічних сортів у Одеській, Миколаївській і Херсонській областях були виявлені кущі виноградних рослин сортів Каберне Совіньйон, Мерло, Одеський чорний, Піно нуар, Шардоне, Сухолиманський білий з симптомами скручування листя (рис. 1, рис. 2).



Рис. 1. Симптоми скручування листя винограду на білоягідному сорті винограду Шардоне (Одеська обл., 2017 р.)



Рис. 2. Симптоми скручування листя винограду на червоноягідному сорті винограду Піно нуар (Одеська обл., 2017 р.)

Фітосанітарне обстеження показало, що найбільший відсоток з симптомами скручування листя виявився в Одеській області, це

можливо пов'язано, в першу чергу, з ураженим садивним матеріалом, а також з агрокліматичними умовами вирощування (рис. 3).

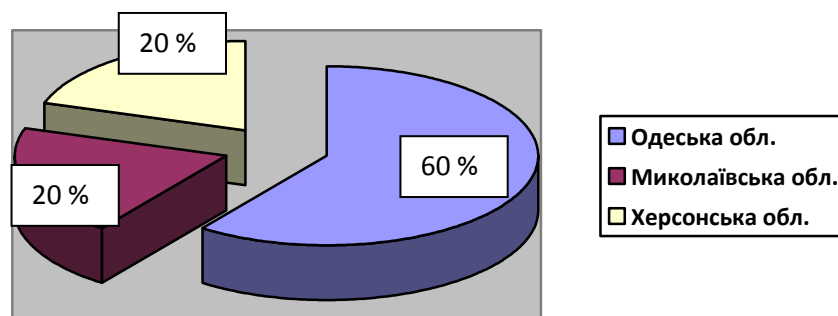


Рис. 3. Результати фітосанітарного обстеження на наявність симптомів скручування листя в виноградарських господарствах півдня України (2017-2018 рр.)

Зразки виноградних рослин, що мали симптоми скручування листя ідентифікували на вірус скручування листя винограду і його серотипи за допомогою методів ІФА і ПЛР. В

результаті проведених досліджень встановлено кущі винограду, які були заражені вірусами винограду (табл. 1).

Таблиця 1. Порівняльний аналіз результатів ідентифікації вірусу скручування листя винограду різними методами.

№ п/п	Сорт, клон винограду	Ідентифікація вірусу <i>GLRaV</i> (1, 3) в виноградних рослинах		
		ІФА	ЗТ-ПЛР	ЗТ- ПЛР-РЧ
1.	Каберне Совінйон, клон 15	+ (3)	+ (3)	+ (3)
2.	Каберне Фран, клон ISV101	-	-	-
3.	Мерло, клон VCR13	+ (3)	+ (3)	+ (3)
4.	Одеський чорний, клон 11	+ (3)	+ (3)	+ (3)
5.	Мускат жовтий, клон FR94	-	-	-
6.	Мускат білий, клон R2	-	-	-
7.	Мускат одеський, клон 3432	-	-	-
8.	Піно нуар, клон 667	+	+	+
9.	Рислінг рейнський, клон 13101	-	-	-
10.	Сухолиманський білий, клон 244	-	+	+
11.	Шардоне, клон 4876	-	+ (3)	+ (3)
12.	Шардоне, клон 76	+	+ (1)	+ (1)

Примітка: «-» - не виявлено; «+» - виявлено; (1),(3) – серотипи *GLRaV*

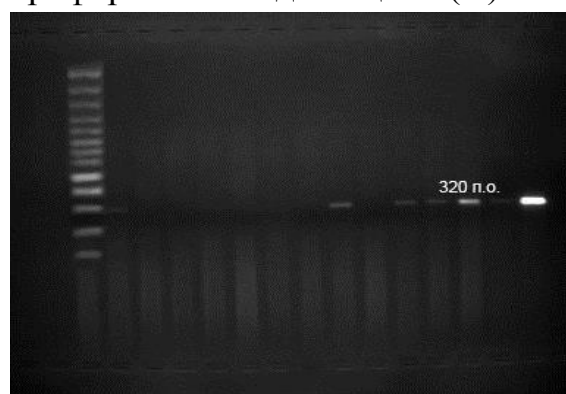
Як видно з таблиці 1, вірус скручування листя було виявлено методом класичної ЗТ-ПЛР і ЗТ-ПЛР у режимі реального часу в усіх виноградних рослинах з симптомами,

в той час як в рослинах сортів Сухолиманський білий, клон 244 і Шардоне, клон 4876 цей вірус не було ідентифіковано методом ІФА.

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

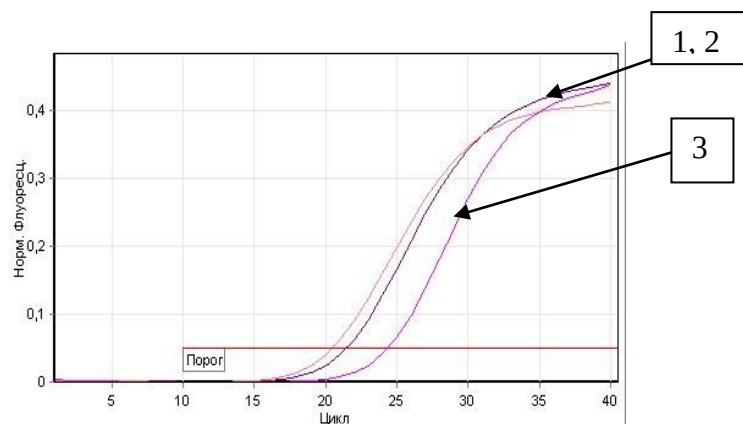
На рис. 4 показано ідентифікацію вірусу скручування листя 1-го серотипу методом ЗТ-ПЛР з електрофоретичною детекцією (А) і

ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією (Б).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

А



Б

Рис. 4. Ідентифікація вірусу скручування листя 1-го серотипу в рослинах винограду сорту Шардоне, клон 76. А - Електрофореграма фрагменту РНК вірусу скручування листя 1-го серотипу, заражені зразки (8, 10, 11, 12), 1, 2 – негативний контроль, 14 - позитивний контроль, М - маркер довжини фрагментів ДНК 50-1000 п.н. (*Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*). Б – гібридизаційно-флуоресцентна детекція по каналу FAM (470/510 нм), 1-2 – позитивний контроль, 3 – фрагмент РНК вірусу скручування листя 1-го серотипу.

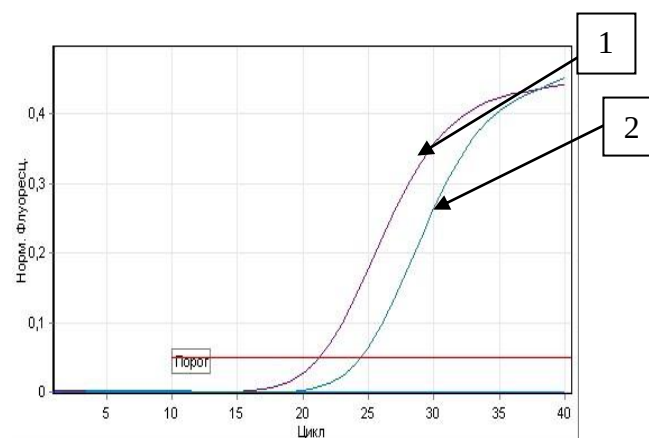
На рис. 5 показано ідентифікацію вірусу скручування листя 3-го серотипу методом ЗТ-ПЛР з електрофоретичною детекцією (А) і

методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією (Б).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

А



Б

Рис. 5. Ідентифікація вірусу скручування листя 3-го серотипу в рослинах винограду сорту Каберне Совіньйон, клон 15. А - Електрофореграма фрагменту РНК вірусу скручування листя 3-го серотипу, заражені зразки (5, 6, 11, 12), 1, 2 – негативний контроль, 8, 9 - позитивний контроль, М - маркер довжини фрагментів ДНК 50-1000 п.н. (*Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*). Б – гібридизаційно-

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

флуоресцентна детекція по каналу FAM (470/510 нм), 1 – позитивний контроль, 2 – фрагмент РНК вірусу скручування листя 3-го серотипу.

Таким чином встановлено, що виноградні рослини, що мали симптоми скручування листя не завжди були уражені цим вірусом, збудником скручування листя винограду. Підтверджено, що уражені виноградні зразки не завжди можна було ідентифікувати методом ІФА. Тільки комплексне дослідження може гарантувати точний результат ідентифікації вірусів рослин винограду.

Висновки і перспективи.

1. Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень в Херсонській, Миколаївській і Одеській областях показало, що найбільш зараженими вірусом скручування листя винограду виявились на виноградниках Одеської області, і імовірно причиною було високий відсоток завезення заражених саджанців імпортного виробництва (Франція, Італія, Сербія).

2. Методами ІФА, ЗТ-ПЛР з електрофоретичною детекцією і ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією підтверджено, що на виноградниках півдня України

поширена вірусна хвороба виноградних рослин – скручування листя винограду, що викликається вірусом скручування 1-го і 3-го серотипів.

3. Встановлено, що симптоми скручування листя не завжди відповідають наявності вірусу в цих рослинах.

4. Вірус скручування листя було виявлено в виноградних рослинах сортів: Каберне Совіньйон, Мерло, Піно нуар, Одеський чорний, Сухолиманський білий, Шардоне.

4. Показано, що методом ІФА не завжди можна ідентифікувати віруси, збудників вірусних хвороб винограду. Так в рослинах винограду сортів Сухолиманський білий, клон 244 і Шардоне, клон 76 методом ІФА не було ідентифіковано вірус скручування листя винограду, який було виявлено методом ЗТ-ПЛР. Для більш точної діагностики необхідно проводити комплексне дослідження виноградного матеріалу при виробництві сертифікованого садивного матеріалу, починаючи з фітосанітарного обстеження і з обов'язковою ідентифікацією методами ІФА і ПЛР.

Список використаних джерел

1. Бойко, А. Л. Екологія вірусів растений. Киев: Вища школа, 1990. 165 с.
2. Martelli G. P. Grapevine Virology Highlights: 2010–2012. *The*

International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine: Proceedings of the 17th Congress of ICSVG. (Davis, California, USA, October 7–4). Davis, 2012. P. 13–31.

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

3. Scheu G. Mein Winzerbuch. Reichenährstand Verlag: Berlin, Germany, 1936. P. 23-28.

4. Жунько І. Д., Ліманська Н. В., Мілкус Б. Н., Іваниця В. О. Віруси та вірусні хвороби винограду (VITIS SP.). *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. № 3. С. 6-17.

5. Вердеревская, Т. Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда. Кишинев: Штинца, 1985. С. 212–242.

6. Oliver J. E. , Fuchs M. Tolerance and resistance to viruses and their vectors in Vitis sp.: A virologist's perspective of the literature. *American Journal of Viticulture and Enology*, 2011. Vol. 62. P. 428–451.

7. Martinson T., Fuchs M., Loeb G. Grapevine leafroll incidence, vectors and impact in the Finger Lakes region of New York. *62nd ASEV National Conference*, Proceedings of the 62nd ASEV National Conference (Monterey, USA). Monterey 2011. P. 139–140.

8. Мілкус, Б. Н., 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

9. Osmana, Fatima, Leutenegger, Christian, Golino, Deborah, Rowhani, Adib. 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. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.012

References

1. Boyko, A. L. (1990). *Ekologia virusov rastenij* [Ecology of plant viruses]. High school, 165.

2. Martelli, G. P. (2012). *Grapevine Virology Highlights: 2010–2012. Proceedings of the 17th Congress of ICVG*. Davis (USA), 13–31.

3. Scheu G. (1936). Mein Winzerbuch. Reichenährstand Verlag: Berlin, Germany, 23-28.

4. Zhunko, I. D., Limanska, N. V., Milkus, B. N., Ivanitsya, V. O. (2015). Virusy ta virusni khvoroby vynohradu (VITIS SP.) [Viruses and Viral Diseases of the Grape (VITIS SP.)]. *Microbiology and Biotechnology*, 3, 6-17.

5. Verderevskaya, T. D. (1985) Virusnie i mikoplazmennie zabolevania plodovix kyltur I vinograda [Viral and mycoplasma diseases of fruit crops and grapes]. *Shtintsa*, 212-242.

6. Oliver, J. E. , Fuchs ,M. (2011). Tolerance and resistance to viruses and their vectors in Vitis sp.: A virologist's perspective of the literature. *American Journal of Viticulture and Enology*, 62, 428–451.

7. Martinson, T., Fuchs, M., Loeb, G.(2011). Grapevine leafroll incidence, vectors and impact in the Finger Lakes region of New York. *Proceedings of the 62nd ASEV National Conference*. Monterey (USA), 139–140.

8. Milkus, B. N., Konup, L. O., Zhunko, I. D., Lymansky, N. V. (2005). Testuvannia deiakix sortiv vinogrady na naiavnist zbudnika bakterialnogo raky i virusiv korotkoyzlia ta skrudivania listia [Testing of some grape varieties for the presence of a bacterial pathogen and Grapevine Fanleaf Virus and Grapevine Leaf Roll-Associated Virus]. *Microbiological Journal*. 67(1), 41-48

9. Osmana, Fatima, Leutenegger, Christian, Golino, Deborah, Rowhani, Adib. (2008). Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. Journal of Virological Methods. 149, 292–299. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.012

ВЫЯВЛЕНИЕ ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА И РАСПРОСТРАНЕНИЕ ЕГО НА ВИНОГРАДНИКАХ ЮГА УКРАИНЫ

**А. И. Конуп, В. Л. Чистякова,
Н. И. Николаева, Л. А. Конуп**

Аннотация. К вредоносным вирусам виноградных растений относится вирус скручивания листьев винограда (GLRaV). Установлено 9 серотипов этого вируса (GLRaV1-9). Наиболее распространенными являются физиологически родственные 1-й и 3-й серотипы. Распространение болезни, возбудителем которой является вирус скручивания листьев, происходит с зараженным посадочным материалом. Поэтому необходима своевременная точная диагностика болезни и идентификация ее возбудителя. Целью исследования было выявление и идентификация вируса скручивания листьев винограда различных серотипов на виноградниках юга Украины. Для достижения цели были поставлены задачи: исследовать степень пораженности виноградников вирусом скручивания листьев; провести серологическую и молекулярно-биологическую диагностику для идентификации GLRaV и сравнить результаты исследования этими методами. Для выполнения этой работы использовали методы: ИФА (иммуноферментный анализ),

классическая ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) и ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В результате исследования выявлен вирус скручивания листьев винограда 1-го и 3-го серотипов на виноградниках юга Украины.

Ключевые слова: вирус скручивания листьев винограда, ИФА, ОТ-ПЦР, виноградники

DETECTION OF GRAPEVINE LEAF ROLL-ASSOCIATED VIRUS OF GRAPES AND THE SPREAD TO VINEYARDS OF SOUTH UKRAINE

**A. I. Konup, V. L. Chistyakova,
N. I. Nikolaeva, L. A. Konup**

Abstract. The Grapevine Leaf Roll-Associated Virus (GLRaV) is a malicious virus of grape plants. The 9th serotypes of this virus have been established (GLRaV1-9). The most common are physiologically related 1st and 3rd serotypes. The spread of the disease, the causative agent of which is the leaf curling virus, occurs with infected planting material. Therefore, timely accurate diagnosis of the disease and identification of its pathogen is necessary. The aim of the study was to identify and identify the Grapevine Leaf Roll-Associated Virus of different serotypes in the vineyards of southern Ukraine. To achieve the goal, the following tasks were set: to investigate the degree of infestation of vineyards with the leaf curling virus; conduct serological and molecular biological diagnostics to identify

Конуп А. І., Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О.

GLRaV and compare the results of research using these methods. To perform this work, the following methods were used: ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), classical RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction), and real-

time RT-PCR. The study revealed of Grapevine Leaf Roll-Associated Virus of the 1st and 3rd serotypes in the vineyards of southern Ukraine.

Keywords: *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus (GLRaV), ELISA, RT-PCR, vineyards, grape viral diseases*