

*Л.О. Конуп, д-р с.-г. наук,  
В.Л. Чистякова, ст. наук. співр.,  
Н.І. Ніколаєва, наук. співр.,  
А.І. Конуп, канд. біол. наук,  
М.І. Рябий, аспірант*

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

*e-mail: lkmicrobiol@ukr.net*

## **ФІТОПЛАЗМОВА ІНФЕКЦІЯ НА ВИНОГРАДНИХ РОСЛИНАХ СОРТУ ШАРДОНЕ І ОЗДОРОВЛЕННЯ ЇХ МЕТОДОМ ТЕРМОТЕРАПІЇ**

*Об'єктом досліджень було: виявлення збудника фітоплазмової інфекції на виноградних рослинах сорту Шардоне, використання методу термотерапії для оздоровлення виноградних рослин, уражених фітоплазмою. Підібрані умови проведення термотерапії. Визначено вплив різних значень високої температури на фізіологічні показники рослин. Метою досліджень було виявлення, діагностика та ідентифікації ураження фітоплазмою виноградних рослин сорту Шардоне на виноградниках Одеської області. Для цього були використані методи: фітосанітарне обстеження, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) і термотерапія. У результаті досліджень було виявлено виноградні рослини, уражені фітоплазмовою інфекцією сорту Шардоне, проведена ідентифікація збудника і підібрані умови проведення термотерапії без ушкодження рослин.*

**Ключові слова:** Фітоплазма, полімеразна ланцюгова реакція, виноград, термотерапія.

*Вступ.* В умовах України бактеріози знищують понад 80% урожаю винограду (Чичинадзе та ін., 1995). Найбільш небезпечним з них є хвороба, що викликає фітоплазма, почорніння деревини винограду. Фітоплазми – специфічна група фітопатогенних організмів, що займають проміжне положення між бактеріями та вірусами. Вони є поліморфними організмами. Фітоплазми належать до класу *Mollicutes*, роду *Mycoplasma* – найпростіші, прокаріоти без клітинної стінки, здатні до самостійної репродукції. Це одноклітинні хемогетеротрофи зі складними харчовими потребами. В основі філогенетичної системи лежить критерій спорідненості первинної структури 16S рибосомальної РНК (Скрипаль, 1984). Клітини мікоплазм оточені лише плазматичною мембраною, товщиною приблизно 10 нм, що обумовлює їх пластичність і різноманітність обрисів клітин. Клітини мають відносно малі розміри. Фітоплазми мають власні системи реплікації ДНК, транскрипції і біосинтезу білка.

Симптоми прояву фітоплазмових захворювань різні. Вони проявляються таким чином: 1 – розвиток зелених квіточок, втрата їх нормальної пігментації, стерильність, філлодія (перетворення частини квіточки у листову структуру); 2 – утворення «відьмових мітел» у результаті проліферації пагонів; 3 – аномальне видовження міжвузля, у результаті чого пагони стають тонкими; 4 – загальне пригнічення (невеликі квіточки та листки, укорочення міжвузля); 5 – знебарвлювання листків або пагонів; 6 – скручування або чашоподібність листків; 7 – куцистість у кінці росту пагонів і загальне пригнічення (карликовість росту, незалежне від сезону почервоніння або пожовтіння листя), що свідчить про значне порушення нормального балансу гормонів або регуляторів росту ( Trivellone et al, 2016; Marcone, 2019). Економічний збиток від фітоплазмової інфекції коливається від часткового зниження урожаю і його якості до повної втрати врожаю. Переносяться фітоплазми комахами, які смочуть сік і належать до родини *Cicadelidea* і *Fulgoridea* (Wei Wei and Yan Zhao, 2022).

В Україні поширена фітоплазмозова хвороба – почорніння. Свою назву має через почорніння недозрілих частин пагонів, які узимку чорніють і відмирають. Переносником є цикадка – *Hyalesthes obsoletus* (Evgeniy Haustov and Victor Bondarciuc, 2021).

*Метою* дослідження було виявлення уражених виноградних рослин сорту Шардоне на виноградниках Одеської та Миколаївської областей, ідентифікація збудника і підбір умов для проведення оздоровлення виноградних рослин методом термотерапії.

*Матеріали і методи дослідження.* Для виявлення фітоплазмозового ураження виноградних рослин сорту Шардоне проводили візуальний огляд виноградних насаджень в Одеській і Миколаївській областях протягом 2019-2020 рр.

Діагностику хвороби та ідентифікацію збудника проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Для ідентифікації збудника відбирали зразки рослин з симптомами ураження. Виділення ДНК і ампліфікацію проводили з використанням комерційних тест-систем (*Qualiplante*, Франція). Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія), який забезпечував розбіг температур від +4 °С до 100 °С в режимі: 1. Денатурація 95 °С – 30 сек.; 2. Відпал 60 °С – 1 хв.; елонгація – 72 °С – 1 хв. (30 циклів); Фінальна елонгація –72 °С – 10 хв. Розчин з продуктами ампліфікації зберігали за -20 °С. Початкова денатурація – 95 °С – 12 хв. Накопичення флуоресцентного сигналу вимірювали за 4-х каналів відповідно: FAM/Green (470 нм/510 нм) для ідентифікації збудника бактеріального раку, JOE/Yellow/HEX (530 нм/555 нм), ROX/Orange (585 нм/610 нм), Cy5/Red (625 нм/660 нм) і Cy3.5/Orange (585 нм/610 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*. Для проведення ПЛР використовували реактиви кваліфікації “для молекулярної біології” (“for molecular biology”), стерильні розчини та посуд.

Для оздоровлення лози від фітоплазмозової інфекції на винограді застосовували водну терапію інфікованих лоз. Для проведення дослідження впливу термообробки на збудника фітоплазмозової інфекції й на фізіологічні параметри самої рослини використовували різні температурні режими та період витримування виноградного матеріалу в гарячій воді. Автори показали (Caudwell, 1997; Caudwell et al, 2008), що існує різноманітність в стійкості чубуків винограду до термообробки. При цьому слід враховувати такі фактори, як сорт рослини, час заготівлі лози та положення чубука на вихідній лозі. Термотерапію проводили в термостаті сухоповітряному TCO-1/80 з використанням різних температурних режимів. Від 30 °С до 52 °С. В дослідженнях використовували по 20 чубуків сорту Шардоне. Вивчали вплив цих умов на основні агробіологічні показники виноградної лози.

*Результати та їх обговорення.* В результаті обстеження виноградників Одеської і Миколаївської областей на сорті Шардоне були виявлені виноградні кущі з симптомами, схожими на вірусне захворювання скручування листя (рис. 1).

Усі уражені рослини мали однакові симптоми: краї листків скручувалися донизу, листя набувало жовтого забарвлення із золотистим відливом, урожай на кущах або був незначним, або його взагалі не було, грони усихали, цукристість знижувалася, кислотність ягід зростала. На листках відмічали некротичні плями, ріст кущів був часто пригніченим, лоза визрівала нерівномірно (рис. 2).

Усі ці симптоми характерні для фітоплазмозових хвороб винограду: золотистого пожовтіння (*Flavescence doree*), що є карантинним об'єктом, і почорніння деревини (*Bois noir*). Симптоми цих хвороб зовнішньо однакові. Ідентифікувати збудника можливо тільки методом ПЛР.

У результаті проведеного ПЛР-аналізу заражених чубуків винограду встановлено, що рослини були уражені збудником почорніння деревини (рис. 3).



Рис. 1. Кущ винограду сорту Шардоне з симптомами ураження фітоплазмозом (Одеська обл., 2019 р.)



Рис. 2. Виноградна лоза сорту Шардоне з симптомами ураження фітоплазмозом (Одеська обл., 2019 р.)

У результаті таких досліджень було встановлено, що виноградні рослини сорту Шардоне з симптомами скручування листя були уражені фітоплазмою, яка викликає хворобу почорніння деревини, а не золотисте пожовтіння винограду, яке є карантинною хворобою.

Для проведення оздоровлення виноградної лози сорту Шардоне проводили занурювання чубуків уражених рослин в гарячу воду з температурою  $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом 10 годин при постійному перемішуванні, що дозволило на 80% оздоровити чубуки від цього захворювання. Згодом були проведені експерименти з вищою температурою ( $+40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) і скороченням часу обробки (5 годин; 30 хвилин). Вивчали вплив цих умов на основні агробіологічні показники виноградної лози. У результаті такої обробки встановлено, що термотерапія впливає на розпускання вічок і утворення калюсу та коренів (табл. 1).

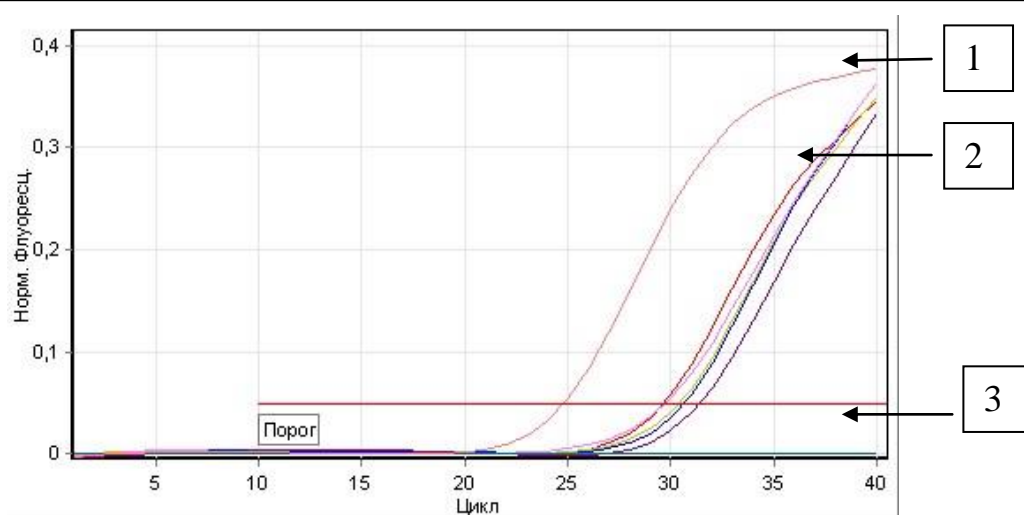


Рис. 3. Результати ідентифікації збудника почорніння деревини винограду на сорті Шардоне методом ПЛР у режимі реального часу: 1 – позитивний контроль (ПКЗ); 2 – уражені рослини, з симптомами фітоплазмової інфекції; 3 – негативний контроль (НКЗ)

Таблиця 1

**Результати впливу температури, часу експозиції на фізіологічні показники чубуків виноградної лози сорту Шардоне (2020 р.)**

Сорт, кількість рослин	Умови проведення досліджень	Утворення калюсної тканини +/-	Проростання вічок, дні		
			15-й	17-й	25-й
Шардоне, 10	30 °C – 10 годин	+	8	9	10
	40 °C – 5 годин	+	7	9	10
	50 °C – 30 хвилин	+	4	8	10
	Контроль	+	10	10	10

Згідно з отриманими результатами, які відображені в таблиці 1, температурні режими в різній експозиції не впливали на утворення калюсу і розпускання вічок на чубуках рослин. Затримка в розпусканні вічок на чубуках відбувалась при температурі +40 °C протягом 5 годин і +50 °C протягом 30 хвилин, але на 25 день всі вічка розпускались. Тобто було показано, що такі температурні режими не впливають на фізіологічні показники досліджених сортів винограду.

Аналізуючи температурні режими, які були досліджені на лабораторному обладнанні, для проведення масової теплової обробки на промисловому обладнанні оптимальним ми б запропонували режим 40 °C протягом 5 годин. Нагрівання до 50 °C створює екстремальні умови для лози. Встановлено, що відразу ж після термотерапії в чубуках винограду починається ферментативне дихання, яке після обробки гарячою водою зберігається 24 години і більше. Очевидно, що з підвищенням температури зростає швидкість ферментативної реакції та при кожному підвищенні температури на 10 °C швидкість ферментативної реакції знижується. Відбувається це внаслідок руйнування вторинної та третинної структур ферменту, відбувається денатурація ферменту. Таким чином, встановлено, що оптимальними умовами проведення термотерапії для оздоровлення лози і

саджанців від фітоплазмової інфекції виявився режим +40 °С протягом 5 годин. Термообробку виноградної лози і саджанців винограду можна рекомендувати виробництву для оздоровлення виноградних рослин, уражених фітоплазмовою інфекцією.

Після обробки саджанців винограду гарячою водою симптоми ураження почорнінням деревини не спостерігалися. Для того, щоб установити, що після термообробки фітоплазми в рослинах відсутні, ми провели тестування пагонів із 10 висаджених кущів за допомогою ПЛР. Результати показали, що у термічно оброблених виноградних кущах фітоплазма відсутня, у той час, як у контролі збудник виявлявся.

Отже, термотерапія є ефективним методом боротьби з таким небезпечним фітоплазмозом, як почорніння деревини. Однак до термотерапії потрібно ставитись з обережністю і дотримуватись наступних правил (Lee et al., 1994; Milkus et al., 2005):

- термотерапію лози необхідно проводити безпосередньо перед щепленням у кінці періоду зберігання. Обробка перед складанням лози на зберігання або у період зберігання категорично недопустима. Після проведення термотерапії тривале зберігання може викликати утворення плісняви на поверхні лози й затримку вегетації;
- перед термотерапією лоза протягом 12-24 годин повинна знаходитись при кімнатній температурі у вологих та аерованих умовах,
- після занурення у воду при температурі 50 °С і обробці протягом 35-45 хвилин температура не повинна змінюватись. У воду не можна додавати будь-які фунгіциди. Воду для термотерапії потрібно міняти кожного дня,
- після термотерапії лозу слід знову утримувати при кімнатній температурі протягом 12-24 годин у вологій та аерованій камері, уникаючи її контакту з холодною водою. Лише потім її можна на короткий час перед щепленням помістити у сховище.

*Висновки.* В результаті проведених фітосанітарних обстежень виноградних насаджень сорту Шардоне в Одеській і Миколаївській областях були виявлені у невеликій кількості рослини (10%) з симптомами фітоплазмозового ураження. Для ідентифікації збудника використовували метод ПЛР у режимі реального часу. В результаті проведених досліджень встановлено, що збудником хвороби виявилася фітоплазма, що викликає почорніння деревини. Для оздоровлення виноградної лози і саджанців хворих на фітоплазмозову інфекцію сорту винограду Шардоне було підібрано температурний режим для оздоровлення рослин за допомогою водної терапії. Встановлено, що температурний режим 40 °С – 5 годин є оптимальним для оздоровлення виноградних рослин, уражених фітоплазмою і негативно не впливає на фізіологічні показники цього сорту винограду.

### Список використаних джерел

1. Чичинадзе Ж. А., Якушина Н. Я., Скориков А. С., Странишевская Е. П.. Вредители болезни и сорняки на виноградниках. Киев : Аграрная наука. 1995. 304 с.
2. Скрипаль И. Г. Биология микоплазм (молликутов). *Успехи микробиологии*. М. : Наука, 1984. Вып. 19. С. 74-106.
3. Trivellone V., Filippin L., Narduzzi-Wicht B., Angelini E., Plant Pathol E. J. 2016. Vol. 145(4). P. 915–927. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0880-3>
4. Marcone C. In: Musetti R., Pagliari L. (eds), *Phytoplasmas: Methods and Protocols*. Vol. 1875. Humana Press, New York, NY, 2019. P. 71-81. [https://doi.org/10.1007/978-14939-8837-2\\_6](https://doi.org/10.1007/978-14939-8837-2_6)
5. Wei Wei and Yan Zhao. *Phytoplasma Taxonomy: Nomenclature, Classification, and Identification Biology* (Basel). 2022 Aug; Vol. 11(8). P. 1119. Published online 2022 Jul 26. DOI: 10.3390/biology11081119
6. Evgeniy Haustov and Victor Bondarciuc. *Hyalesthes obsoletus* is an active vector of Wood blackening in the Republic of Moldova. BIO Web Conf. Volume 34, 2021 International Scientific

Conference “Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture”  
*Biologization*. 2021. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213404020>

7. Caudwell A. Flavescence doree elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Australian J. of Grape and Wine Research*. 1997. Vol. 3. P. 21-25.
8. Caudwell A., Larruee J., Boudon-Padieu E., Mclean G. D. Elimination of grapevine flavescence dorée from dormant wood by hot water treatment. March 2008. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Vol. 3(1). P. 21–25. DOI:10.1111/j.1755-0238.1997.tb00112.x
9. Lee I.-M., Gundersen D. E., Hammond R. W., and Davis R. E. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in single host plant. *The Amer. Phytopath. Soc.* 1994. Vol. 84. N 6. P. 559-566. DOI: 10.1094/Phyto-84-559
10. Milkus B., Clair D., Idir S., Habili N. and Boudon-Padieu. First detection of stolbur phytoplasma in grapevines (*Vitis vinifera*, cv Chardonnay) affected with grapevine yellows in the Ukraine. *New Disease Reports*. 2005. P. 7. March 2005. *Plant Pathology*. Vol. 54(2). P. 236–236. DOI:10.1111/j.1365-3059.2005.01121.x

**L. Konup**, Dr of Agr. Scs, **V. Chistyakova**, Senior Researcher, **N. Nikolaeva**, Researcher,  
**A. Konup**, PHD in Biology, **M. Riabyi**, Postgraduate

National Scientific Center “V. Ye. Tairov Institute of Viticulture and Winemaking”, Ukraine

#### **PHYTOPLASMA INFECTION ON GRAPE PLANTS OF THE CHARDONNAY VARIETY AND THEIR RECOVERY BY THERMOTHERAPY**

*The object of research was: detection of the pathogen of phytoplasma infection on grape plants of the Chardonnay variety, use of the thermotherapy method for the recovery of grape plants affected by phytoplasma. Selected conditions for thermotherapy. The influence of different values of high temperature on the physiological indicators of plants was determined. The aim of the research was detection, diagnosis and identification of phytoplasma damage of grape plants of the Chardonnay variety in the vineyards of Odesa region. For this, the following methods were used: phytosanitary examination, polymerase chain reaction (PCR) and thermotherapy. As a result of the research, grape plants affected by Chardonnay phytoplasma infection were identified, the causative agent was identified and the conditions for thermotherapy were selected without damaging the plants.*

**Keywords:** Phytoplasma, polymerase chain reaction, grapes, thermotherapy.