

УДК 634.8:576.858.8

**А. В. Щербина**, мол. наук. сп.

Національний науковий центр "Інститут виноградарства і виноробства ім. В. Є. Таїрова", лабораторія вірусології і мікробіології, вул. 40-річчя Перемоги, 27, смт. Таїрово, Одеса, 65496, Україна

## ТЕСТУВАННЯ КЛОНІВ ВІНОГРАДУ НА ВІРУСНІ ХВОРОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Для тестування клонів винограду на приховане ураження вірусними хворобами було застосовано "сендвіч"-метод та непрямий "сендвіч"-метод імуноферментного аналізу. Проведено тестування клонів на латентне ураження вірусами коротковузля (GFLV), першим і третім серотипами вірусу скручування листя (GLRaV I і GLRaV III), мармуровості (GFkV) та вірусом А (GVA) винограду. Всього перевірено 48 клонів 20 прищепних сортів і 22 клонів 6 підщепних сортів винограду. Для подальшої роботи і розмноження буде використано здоровий вихідний матеріал 39 клонів прищепних сортів і 22 клонів підщепних сортів.

**Ключові слова:** вірус, клони прищеп і підщеп, імуноферментний аналіз.

Лабораторне тестування клонів винограду на приховане ураження найбільш шкідливою вірусною інфекцією є складовою частиною санітарної селекції, яку здійснюють водночас із клоновим доббором. Система отримання вільних від вірусної інфекції клонів та розмноження сертифікованого садивного матеріалу винограду використовується у ряді виноградарських країн Європи, в тому числі у Франції, Німеччині та Італії. Застосування здорових клонів для закладення промислових виноградників дає можливість підвищити урожай та якість його кондицій, збільшити строки експлуатації насаджень. В Україні система сертифікації садивного матеріалу винограду знаходиться на етапі остаточного становлення. Її функціонування буде визначати в наступні роки рівень українського виноградарства та розсадництва.

Тестування клонів здійснюють за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА), в останні десятиріччя застосовують молекулярно-біологічні методи [1]. Імуноферментний аналіз є методом, що найчастіше застосовується за тестування клонів [2]. Його переваги полягають у швидкості виконання аналізу, високій чутливості та специфічності [3]. Європейська Спілка вважає необхідним проведення першочергового тестування методом ІФА на такі шкідливі вірусні захворювання, як коротковузля, перший та третій серотипи скручування листя винограду, мармуровість та вірус А винограду, що асоційований із борознистістю деревини винограду [4]. Роботами зарубіжних вчених в останні роки розроблено ряд модифікацій та вдосконалень методу ІФА,

які підвищують його можливості у виявленні вірусів винограду [5, 6]. Таким чином, висока надійність методу ІФА при тестуванні вірусних хвороб винограду, дозволяє спиратися на його результати у процесі добору здорових клонів рослини [7].

Мета наших досліджень полягала у проведенні тестування клонів першого та другого вегетативного поколінь на вірусні хвороби і вибраковуванні в разі необхідності інфікованих клонів. Для цього провадили імуноферментний аналіз на наявність вірусів коротковузля, скручування листя (перший та третій серотип), мармуровості та вірусу А винограду.

### Матеріали і методи дослідження

Клони винограду, що отримані та досліджуються в ІВіВ ім. В. Є. Таїрова, проходять стандартне тестування методом ІФА на наявність найбільш шкідливих вірусних патогенів — GFLV (вірус коротковузля винограду), GFkV (вірус мармуровості винограду), GLRaV I і GLRaV III (вірус скручування листя винограду, I і III серотипи) і GVA (вірус А винограду, асоційований з борознистістю деревини) [8]. Тестування провадили на етапі  $P_0$ , тобто на кущах, які є родоначальниками клонів. Крім того, здійснювали періодичний контроль на етапах першого і другого вегетативного поколінь ( $P_1$ ,  $P_2$ ). Це дозволяло відбирати клони, вільні від шкідливих вірусних хвороб, ураження якими погіршує агробіологічні показники кущів винограду.

Ідентифікацію вірусів коротковузля, скручування листя (перший та третій серотипи), мармуровості та вірусу А винограду провадили за допомогою діагностичних наборів фірми "AgriTest" (Італія) подвійним "сендвіч"-прямим методом (DAS-ELISA) та "сендвіч"-непрямим методом ІФА (DASI-ELISA). При виконанні досліджень використовували прийоми, розроблені автором раніше [9], що дозволяють оптимізувати ІФА та отримати вірогідні результати. Зокрема, проби для аналізу відбирали з тих частин куща та вегетативних органів, де концентрація вірусних часток була вищою. Як зразки для аналізу найчастіше використовували листя, черешки чи жилки листя, а також зелені пагони. У період спокою використовували зскрібки кортикального шару здерев'янілої лози. Тестування провадили на протязі чотирьох років на 48 клонах 20 технічних та столових сортів винограду, а також на 22 клонах шести підщепних сортів.

### Результати досліджень та їх аналіз

При тестуванні клонів технічних сортів винограду (табл. 1) вірус коротковузля виявлено на семи кущах клону 1076 сорту Каберне Совіньйон. Приховане ураження першим серотипом вірусу скручування листя було виявлено на одному кущі клону 14174 сорту Ріслінг рейнський та третім серотипом на одному кущі клону 425 сорту Фетяска.

Таблиця 1

**Тестування кущів клонів технічних сортів винограду на приховану вірусну інфекцію методом імуноферментного аналізу (1996–1999 рр.)**

Сорт	Номер клону	Кількість кущів (всього перевірено/з них хворих)				
		GFLV	GLRaV I	GLRaV III	GFkV	GVA
<b>Каберне Совіньон</b>	441	22/0	16/0	11/0	22/1	11/0
	1076	29/7	21/0	10/0	29/0	10/0
Марсельський чорний ранній	1294	13/0	13/0	12/0	13/0	12/0
Фетяска	425	14/0	12/0	12/1	13/2	13/0
Трам'єр рожевий	3360	22/0	14/0	14/0	14/0	15/0
	441	4/0	1/0	1/0	1/0	1/0
	1494	1/0	1/0	1/0	1/0	1/0
Сухолиманський білий	1632	32/0	20/0	19/0	31/0	31/0
	5110	39/0	39/0	38/0	39/2	38/0
	244	22/0	22/0	21/0	22/2	21/0
Рислінг рейнський	6846	11/0	10/0	10/0	10/0	11/0
	2071	13/0	13/0	13/0	13/5	13/0
	14174	13/0	10/1	10/0	13/4	10/0
	14161	17/0	17/0	17/0	17/6	17/0
Іршаї Олівер	3524	8/0	7/0	7/0	7/0	8/0
	1881	7/0	7/0	7/0	7/0	7/0
Голубок	1685	10/0	5/0	5/0	10/0	5/0
	662	9/0	3/0	3/0	9/0	3/0
	36103	7/0	2/0	2/0	7/0	2/0
Совіньон зелений	3873	7/0	7/0	7/0	7/0	7/0
Ркацителі	6054	13/0	13/0	13/0	13/3	13/0
	2222	13/0	13/0	13/0	13/0	13/0
	5081	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
	5145	9/0	9/0	9/0	9/0	9/0
Шардоне	4536	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0
	4876	4/0	4/0	4/0	4/0	4/0

Примітка. Тут і далі: GFLV — вірус коротковузля, GLRaV I — перший серотип вірусу скручування листя, GLRaV III — третій серотип вірусу скручування листя, GFkV — вірус мармуровості, GVA — вірус А винограду

Значно більша прихована ураженість вірусом мармуровості. Мармуровість виявлено на одному кущі клону 441 сорту Каберне Совіньон, двох кущах клону 5110 та двох кущах клону 244 сорту Сухолиманський білий, 15 кущах сорту Рислінг рейнський (клони 2071, 14174 та 14161, на яких уражено відповідно 4, 5 та 6 кущів), трьох кущах клону 6054 сорту Ркацителі та двох кущах клону 425 сорту Фетяска. Вірус А на клонах технічних сортів не виявлено.

Таким чином, на клонах технічних сортів найчастіше зустрічається вірус мармуровості винограду. Найбільш сильно цим вірусом уражені клони сорту Рислінг рейнський (вірус відзначено на трьох клонах з чотирьох тестованих, причому кількість уражених кущів на клон сягає від 4 до 6, тобто складає приблизно 10–35 відсотків уражених рослин на клон). Відносно високий ступінь прихованого ураження виявлено також на клонах сорту Сухолиманський білий (до 2-х уражених рослин на клон, тобто 5–10 відсотків уражених рослин на клон).

Клони, уражені вірусами коротковузля та скручування листя, вилучені з процесу подальшого розмноження.

На клонах столових сортів приховане ураження вірусами коротковузля, I і III серотипами вірусу скручування листя, мармуровості та вірусом А винограду не виявлено (табл. 2).

Таблиця 2

**Тестування кущів клонів столових сортів винограду на приховану вірусну інфекцію методом імуноферментного аналізу (1996–1999 рр.)**

Сорт	Кільк. клонів	Кількість кущів (всього перевірено/з них хворих)				
		GFLV	GLRaV I	GLRaV III	GFkV	GVA
Мускат таїровський	1	51/0	15/0	7/0	51/0	43/0
Мускат гамбурзький	5	51/0	44/0	42/0	51/0	49/0
Одеський сувенір	4	28/0	28/0	28/0	28/0	28/0
Мускат Аддо	3	12/0	12/0	12/0	12/0	12/0
Восторг	3	12/0	12/0	12/0	12/0	12/0
Оригінал	2	9/0	9/0	9/0	9/0	9/0
Зоряка	1	6/0	6/0	6/0	6/0	6/0
Мускат жемчужний	1	2/0	2/0	2/0	2/0	2/0
Мускат янтарний	2	8/0	8/0	8/0	8/0	8/0

Вірусні хвороби не виявлені також на тестованих кущах клонів підщеп винограду сортів Ріпарія х Рупестріс 101-14, Берландієрі х Ріпарія СО4, Кобера 5ББ, 41 Б, Кречунел 2, Ріпарія Глуар де Монпельє (табл. 3).

Нами встановлено, що шкідливі вірусні хвороби зустрічаються на кущах клонів значно рідше, ніж полумлатентні, типу мармуровості. Це можна пояснити тим, що коротковузля і скручування листя впливають на агробіологічні показники виноградного куща, зокрема, на його врожай і кондиції якості. Тому клони, що навіть не проявляють візуально симптомів коротковузля, можуть бути відбраковані на підставі санітарної або агробіологічної оцінки. Мармуровість є захворюванням, яке знижує тільки показники приживлюваності, але не впливає

на агробіологічні параметри. Крім того, захворювання візуально не проявляється ані на прищепних, ані на підщепних сортах (за винятком сорту Рупестріс дю Ло). Тому санітарна селекція і агробіологічні спостереження не призводять до вибраковування рослин, інфікованих мармуровістю.

Таблиця 3

**Тестування кущів клонів підщеп винограду на приховану вірусну інфекцію методом імуноферментного аналізу (1996–1999 рр.)**

Об'єкт дослідження	Кільк. клонів	Кількість кущів (всього перевірено/з них хворих)				
		GFLV	GLRaV I	GLRaV III	GFkV	GVA
Ріпарія х Рупестріс 101-14	6	101/0	52/0	42/0	68/0	47/0
Берландієрі х Ріпарія СО 4	5	55/0	46/0	31/0	58/0	40/0
Кобера 5 ББ	4	28/0	28/0	28/0	28/0	28/0
41 Б	3	21/0	21/0	21/0	21/0	21/0
Кречунел 2	2	14/0	14/0	14/0	14/0	14/0
Ріпарія Глуар де Монпельє	2	14/0	14/0	14/0	14/0	14/0

Цілоком можливо, що високий ступінь ураження (3–7 хворих кущів на клон) свідчить про те, що існує висока ймовірність ураження усіх рослин клону, бо вони мають спільне походження від однієї рослини. Те, що на інших тестованих кущах клону хвороба не виявлена, може бути наслідком того, що концентрація вірусних часток у рослині ще не є достатньою для виявлення хвороби методом ІФА, або ж вірус не був виявлений через нерівномірний розподіл його в тканинах. Якщо виявлено лише один чи два уражених кущі на клон, це може бути пов'язане із вторинним ураженням вірусом, що насамперед стосується вірусу скручування листя, який передається кокцидами у польових умовах, та вірусу коротковузля, який переноситься нематодами. У тих випадках, коли виявляли одну — дві уражені рослини на клон, провадили додаткове тестування у той же сезон вегетації; якщо позитивний результат отримували знову, тестування повторювали наступного року.

Таким чином, клоновий добір разом із візуальною санітарною селекцією, як правило, сприяє вилученню основної кількості рослин, уражених шкідливою вірусною інфекцією (коротковузля, скручування листя). Що стосується полупатентних захворювань (мармуровість винограду), то ступінь ураження ними знижується у меншій мірі через відсутність прояву візуальних симптомів та помітного впливу на агробіологічні показники виноградної рослини.

Подальші дослідження будуть направлені на продовження тестування методом ІФА тих кущів і клонів, які не ввійшли у репрезентовану вибірку.

## Висновки

1. Клоновий добір та санітарна селекція є ефективним засобом отримання здорового садивного матеріалу винограду.
2. Для подальшої роботи і розмноження рекомендовано здоровий вихідний матеріал 39 клонів прищепних сортів і 22 клонів підщепних сортів винограду.

Висловлюю глибоку вдячність доктору біологічних наук Мілкусу Б. Н. за сприяння під час проведення роботи.

## Література

1. *Walter B., Martelli G.* Clonal and sanitary selection of the grapevine // In: B. Walter (Ed.): Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. Les Colloques de l'INRA. — 1997. — V. 86. — P. 43–95.
2. *Walter B. and Martelli G.* Consideration on grapevine selection and certification // *Vitis*. — 1998. — V. 37, № 2. — P. 87–90.
3. *Boscia D., Digiario M., Fresno J., Greif C., Grenan S., Kassemeyer H. H., Prota V. A., de Sequeira O. A.* ELISA for the detection and identification of grapevine viruses // In: B. Walter (Ed.): Sanitary selection of the grapevine. Protocols for detection of viruses and virus-like diseases. Les Colloques de l'INRA. — 1997. — V. 86. — P. 129–155.
4. *Martelli G. P.* Grapevine viruses and certification in EEC countries: state of the art // Proc. of a panel discussion and seminar. Valenzano (Bari), Italy. — 1991. — P. 101–110.
5. *Walter B.* Advances in grapevine virus diseases diagnosis since 1990 // Ext. Abst. 11th Meet. ICVG. — Montreux, Switzerland. — 1993. — P. 127–130.
6. *Martelli G. P.* Grapevine virology highlights 1994–1997 // Proc. 12th Meet. ICVG, Lisbon, Portugal. — 1997. — P. 7–14.
7. *Boidron R.* Clonal selection in France. Methods, organization and use // Proc. Int. Symp. Clon. Sel. — Portland (Oregon, USA). — 1995. — P. 1–7.
8. *Мілкус Б. Н., Карпузова В. И., Мулюкина Н. А., Гайдай А. Е., Конун Л. А.* Биотехнологические методы диагностики вирусных болезней и бактериального рака винограда // Виноградарство и виноделие. — Сб. научн. трудов. — 1997. — С. 32–37.
9. *Щербина А. В.* Відбір зразків для виявлення пошкодження винограду за допомогою ІФА // Захист рослин. — 2002. — № 3. — С. 18.

## А. В. Щербина

Национальный научный центр "Институт виноградарства и виноделия им. В. Е. Таирова", лаборатория вирусологии и микробиологии, ул. 40 лет Победы, 27, пгт. Таирово, Одесса, 65496, Украина

## ТЕСТИРОВАНИЕ КЛОНОВ ВИНОГРАДА НА ВИРУСНЫЕ БОЛЕЗНИ ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

### Резюме

Для тестирования клонов винограда на скрытое поражение вирусными болезнями были использованы "сэндвич"-метод и непрямой "сэндвич"-метод иммуноферментного анализа. Проведено тестирование клонов на латентное поражение вирусами короткоузлия (GFLV), первым и третьим серотипами вируса скручивания листьев (GLRaV I и GLRaV III), мраморности (GFkV) и вирусом А винограда (GVA). Всего проверено 48 клонов 20 привойных сортов и 22 клонов 6 подвойных

сортов винограда. Для дальнейшей работы и размножения будет использован здоровый исходный материал 39 клонов привойных сортов и 22 клонов подвойных сортов.

**Ключевые слова:** вирус, клоны подвойных и привойных сортов.

**A. V. Scherbina**

National scientific center "Tairov Research Institute  
of viticulture and wine-making",  
40 let Pobeda str., 27, smt. Tairovo, Odessa, 65496, Ukraine

**VIRUS DISEASES DETECTION ON GRAPEVINE CLONES BY  
ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

**Summary**

"Sandvich"-method and indirect enzyme-linked immunosorbent assay were used for latent virus infection detection on grapevine clones. Clones were tested for grapevine fanleaf virus, grapevine leafroll virus (I and III serotypes), grapevine fleck virus and grapevine virus A. 48 clones of 20 scion cultivars and 22 clones of 6 rootstocks cultivars were tested. 39 clones of scions and 22 clones of rootstocks will be used for the next propagation of healthy initial planting material.

**Keywords:** virus, scion and rootstock clones, enzyme-linked immunosorbent assay.