

**МІНІСТЕРСТВО НАУКИ І ОСВІТИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**КОНУП АНАСТАСІЯ ІГОРІВНА**

УДК 578.5.632.38:634.8.03/05

**ДІАГНОСТИКА ВІРУСНИХ ХВОРОБ ВИНОГРАДУ  
ПРИ СТВОРЕННІ СЕРТИФІКОВАНОГО БЕЗВІРУСНОГО САДИВНОГО  
МАТЕРІАЛУ ВИНОГРАДУ В УКРАЇНІ**

06.01.11 «Фітопатологія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Національному науковому центрі «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» Національної академії аграрних наук України

**Науковий керівник** доктор біологічних наук, професор  
**Мілкус Борис Наумович**,  
Одеський державний аграрний університет,  
професор кафедри захисту, генетики  
та селекції рослин

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Слюсаренко Олександр Миколайович**,  
Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова,  
директор ботанічного саду

кандидат біологічних наук  
**Гринчук Катерина Валеріївна**,  
Національний університет біоресурсів  
і природокористування України,  
в. о. доцента кафедри молекулярної біології,  
мікробіології та біобезпеки

Захист відбудеться «11» грудня 2019 року о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.02 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «08» листопада 2019 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

М. С. Мороз

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Вірусні хвороби широко розповсюджені на виноградних ділянках в усьому світі і є причиною великих збитків врожаїв у виноградарських господарствах. Кількість їх є значною і з кожним роком з'являються все нові форми вірусів – збудників цих хвороб. Віруси винограду дуже впливають на якість виноградних рослин, продукцію виноградарства, знижується цукристість, вихід саджанців у шкілці, а також довговічність виноградних кущів. Сучасне виноградарство України повинно базуватися на міжнародних стандартах якості. Згідно з правилами європейської системи сертифікації, технологія отримання якісного садивного матеріалу виноградних рослин передбачає обов'язкове тестування рослин винограду на наявність шкідливих вірусів за допомогою сучасних методів ідентифікації збудників хвороб виноградних рослин на всіх етапах розмноження у спеціалізованих лабораторіях, а також проводити оздоровлення цінних сортів і клонів винограду, уражених вірусами винограду.

До шкідливих вірусів винограду, що входять до системи санітарної сертифікації садивного матеріалу, відносяться: вірус скручування листя винограду з першого по дев'ятий серотип – *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus (1–9) (GLRaV1-9)*; вірус коротковузля винограду – *Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)*; вірус мармуровості листя винограду – *Grapevine Fleck Virus (GFkV)*; вірус А винограду – *Grapevine Virus A (GVA)* і вірус Б винограду – *Grapevine Virus B (GVB)* комплексу борознистості деревини виноградної лози.

Серед найбільш розповсюджених шкідливих вірусів виноградної лози в Європі перше місце займає вірус коротковузля, на другому місці – вірус скручування листя. В США, Австралії та Новій Зеландії ці хвороби інколи набувають великих масштабів (Almeida R. P. P., Daane K., Bell V., 2013). У виноградних рослинах, заражених вірусом скручування листя винограду спостерігається зменшення вмісту цукру в ягодах (16–20 %), а збитки від втрати врожаю при цьому складають від 10 до 48 % (Almeida R. P. P., Daane K. et al., 2013).

На жаль, нині в Україні залишилося дуже мало вітчизняних розсадницьких господарств, що виробляють якісний сертифікований садивний матеріал винограду. Тому виноградарські господарства завозять на територію України велику кількість саджанців, як столових, так і технічних сортів імпортного виробництва. Найчастіше це садивний матеріал винограду із країн Центральної та Південної Європи, з Австрії, Німеччини, Франції, Сербії і, незважаючи на етикетку з позначенням категорії «сертифікований», він дуже часто буває зараженим вірусами та збудниками інших хвороб винограду (Milkus V. et al., 2003).

В основі виробництва безвірусного садивного матеріалу виноградних рослин покладено відбір здорових рослин з метою їх подальшого розмноження.

Цілком очевидно, першим кроком цього процесу повинен бути постійний моніторинг виноградних насаджень з метою своєчасного виявлення та ліквідації осередків вірусної інфекції, обмеження розповсюдження вірусних

хвороб і попередження епіфітотій. Найважливішу роль у запобіганні поширення вірусів виконує санітарний і лабораторний контроль садивного матеріалу виноградних рослин з використання сучасних методів діагностики. Серед них особливо можна виділити серологічні методи, а саме метод імуноферментного аналізу і молекулярно-біологічні методи – метод полімеразної ланцюгової реакції, який в останні роки має різні модифікації. Впровадження методу полімеразної ланцюгової реакції в лабораторну практику стало однією з найважливіших подій в лабораторній діагностиці.

Використання сучасних методів діагностики дозволяє за короткий термін провести скринінг великої кількості зразків виноградних рослин на зараженість вірусними хворобами виноградних рослин, вивчити, спрогнозувати і запобігти розповсюдженню збудників вірусних хвороб на виноградниках півдня України. Для отримання якісного сертифікованого садивного матеріалу та проведення контролю щодо розповсюдження вірусних хвороб виноградних рослин необхідно застосовувати в комплексі серологічні і молекулярно-біологічні методи діагностики, оптимізувати умови їх проведення для перевірки великої кількості рослин на вміст збудників цих хвороб.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертацію виконано на базі лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН, акредитованої відповідно до міжнародного стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 (2005) і в межах науково-дослідницьких робіт Національної академії аграрних наук України: «Комплексна оцінка впливу вірусних хвороб винограду на якість продукції виноградарства» (номер державної реєстрації 0111U003754); «Розробити та застосувати комплекс молекулярно-біологічних методів діагностики вірусних і бактеріальних хвороб винограду з метою отримання здорового садивного матеріалу цінних сортів і клонів винограду» (номер державної реєстрації 0198U002660); «Моніторинг вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб винограду в Україні з метою визначення шляхів підвищення якості продукції виноградарства і виноробства до рівня вимог ЄС на 2016–2020 рр.» (номер державної реєстрації 0116U001166).

**Мета та завдання дослідження.** Мета дисертаційного дослідження – вивчення розповсюдження вірусних хвороб рослин на виноградних насадженнях України, удосконалення методів їх діагностики та ідентифікації вірусів – збудників хвороб винограду для отримання якісного сертифікованого садивного матеріалу вітчизняного виробництва.

Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

- дослідити зараженість виноградників вірусними хворобами на півдні України за проявом типових симптомів;
- удосконалити метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією з використанням флуоресцентної детекції для ідентифікації вірусів винограду у режимі реального часу;
- провести молекулярно-біологічну діагностику для ідентифікації збудників вірусних хвороб винограду: скручування листя винограду,

коротковузля винограду, мармуровості винограду, вірусу А комплексу борознистості деревини винограду, які циркулюють на території півдня України;

– визначити серотипи вірусу скручування листя, які викликають відповідну хворобу на виноградниках України;

– оцінити перспективність використання біосенсору ZnO (ALD-технологія) за зміною у спектрах фотолюмінесценції при адсорбції біологічних молекул для ідентифікації вірусу А комплексу борознистості деревини винограду;

– застосувати комплекс методів діагностики вірусних хвороб винограду для оцінки санітарного стану банку клонів та базових маточників винограду у виноградарських розсадниках України.

*Об'єкт дослідження* – молекулярно-біологічна, серологічна діагностика вірусних хвороб винограду, ідентифікація вірусів винограду за допомогою цих методів і ALD-технології.

*Предмет дослідження* – віруси винограду: вірус скручування листя першого і третього серотипів (*GLRaV1*, 3), вірус коротковузля винограду (*GFLV*), вірус мармуровості листя винограду (*GfKV*), віруси комплексу борознистості деревини винограду: вірус А винограду (*GVA*) і вірус Б винограду (*GVB*). Матеріалом для тестування були: виноградна лоза з виноградників Одеської, Миколаївської і Херсонської областей; виноградні рослини з банку клонів та маточнику клонів лабораторно-тепличного комплексу Центру клонової селекції Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН, Державного підприємства «Дослідне господарство «Таїровське», Державного підприємства «Дослідне господарство імені О. В. Суворова»; з базових і сертифікованих маточних насаджень прищепних і підщепних сортів винограду Одеської області.

**Методи досліджень:** візуальне обстеження виноградних насаджень, серологічний і молекулярно-біологічні методи діагностики вірусних хвороб, методи для обчислювання результатів. Дослідження проведено відповідно до атестованих методик: МВВ 002-85/3-2006. Виявлення збудника бактеріального раку (*Agrobacterium tumefaciens (vitis)*) винограду методом полімеразної ланцюгової реакції, ДСТУ 3355-06 «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб при карантинному огляді та експертизи», ДСТУ 4390:2005 «Технічні умови. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози», ДСТУ 8562:2015 «Маточники та садивний матеріал. Методи виявлення збудників вірусних хвороб та бактеріального раку».

Для ідентифікації вірусів виноградних рослин використовували лабораторне обладнання ПЛР-лабораторії, яке пройшло калібрування в Національному науковому центрі «Інститут метрології» (м. Харків) та Державному підприємстві «Одесастандартметрологія» (м. Одеса).

**Наукова новизна одержаних результатів.** Удосконалено та вперше в Україні валідовано метод полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального

часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією для ідентифікації вірусів винограду з використанням українських ізолятів.

Вперше в Україні в результаті скринінгу різних серотипів вірусу скручування листя винограду ідентифіковано дев'ятий серотип цього вірусу.

Вперше продемонстровано можливість використання біосенсору на основі *ALD* – технології (*Atomic Layer Deposition*) для ідентифікації вірусу А комплексу борознистості деревини винограду.

Вперше методом секвенування було показано, що зразок сорту Каберне Совіньйон (Одеська область, 2018 р.) клонового походження, уражено вірусом коротковузля, нуклеотидна послідовність гена білка оболонки цього вірусу кластеризується з нуклеотидними послідовностями штамів вірусів коротковузля, виділених з винограду сортів Каберне Совіньйон і Цинфандель з Каліфорнії (США). Нуклеотидна послідовність була анотована в GenBank (США).

**Практичне значення одержаних результатів.** За результатами обстеження виноградників півдня України встановлено, що найчастіше зустрічаються виноградні рослини, заражені скручуванням листя, збудником якого є вірус скручування листя винограду першого і третього серотипів, а також коротковузлям винограду, збудником якого є вірус коротковузля виноградної лози. Вперше на виноградниках півдня України ідентифіковано вірус скручування листя винограду дев'ятого серотипу. Удосконалено та запропоновано метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією, завдяки чому стало можливим ідентифікувати віруси виноградної лози без використання гель-електрофорезу і визначати їх кількісну оцінку.

За результатами досліджень на метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у реальному часі з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією отримано патент на корисну модель «Спосіб діагностики вірусів винограду». Впроваджено високоефективний метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у реальному часі для діагностики вірусних хвороб при виробництві саджанців в Державному підприємстві «Дослідне господарство «Таїровське».

Ці методи діагностики дають можливість створити високоефективну санітарну складову системи отримання здорового сертифікованого садивного матеріалу винограду, побудовану на принципах економії ресурсів, швидкого та селективного виявлення фітопатогенів та екологічної безпеки.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є самостійною роботою автора. Здобувачем проведено розширений інформаційний пошук та проаналізовано літературні джерела. Планування схем експерименту, отримання експериментальних даних, їх узагальнення та інтерпретація, оптимізація умов проведення методу полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією, підготовка публікацій за отриманими результатами згідно з темою автором дисертації здійснено особисто. Обґрунтування та опрацювання висновків, тексту дисертації та автореферату здійснено особисто здобувачем. Окремі факти та закономірності інтерпретувалися з урахуванням

порад та консультацій наукового керівника і фахівців Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова». Дослідження по ідентифікації вірусу А комплексу борознистості деревини винограду з використанням біосенсору на основі ALD-технології проводили спільно з науковим співробітником кафедри експериментальної фізики Одеського національного університету імені І. І. Мечникова А. В. Терещенко. Проведення та аналіз нуклеотидних послідовностей генів вірусів винограду здійснено за участю колег з Південного наукового центру Російської академії наук. Метеорологічні показники за роки дослідження було надано співробітниками відділу агроекології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В. Є. Таїрова» НААН.

З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише ті ідеї та положення, які є результатом особистої роботи здобувача.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертації було представлено на: XII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського (м. Ужгород, 2009 р.); Всеукраїнській конференції «Фітосанітарна безпека та біоекологія застосування пестицидів (м. Чернівці, 2010 р.); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва» (м. Сколе, 2010 р.); VI Міжнародній науково-практичній конференції «Геном рослин VI. «Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека» (м. Одеса, 2010 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених «Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва» (м. Яремче, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених і спеціалістів «Інноваційні технології в розвитку столового виноградарства» (м. Одеса, 2011 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 40-річчю з дня організації Інституту захисту рослин (м. Мінськ, Республіка Білорусь, 2011 р.); 17<sup>th</sup> ICVG Meeting (м. Девіс, США, 2012 р.); Міжнародній конференції «Актуальные вопросы в современной науке» (м. Варшава, Республіка Польща, 2013 р.); Міжнародній конференції молодих вчених «Actual Problems of Microbiology and Biotechnology» (м. Одеса, 2015 р.); 18<sup>th</sup> ICVG Meeting (м. Анкара, Турецька Республіка, 2015 р.); VIII Міжнародній конференції «Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2018)» (м. Одеса, 2018 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 21 наукову працю, з яких розділ в монографії, 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні іншої держави, 2 статті в інших наукових виданнях, 12 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 172 сторінках. Робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, основних методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву,

списку використаних джерел (207 найменувань, з яких 192 латиницею) та додатків. Дисертація містить 17 таблиць та 32 рисунки.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури наведено характеристику основних вірусів винограду, що входять до переліку обов'язкового тестування рослин при виробництві сертифікованого садивного матеріалу, симптоми вірусних хвороб, їх шкодливість, поширення у світі та збитки, які вони завдають виноградарству, подано характеристику методів діагностики вірусних хвороб, а також заходів щодо захисту винограду від цих хвороб, наведено технологію виробництва сертифікованого садивного матеріалу винограду.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведено протягом 2010–2018 рр. у лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства імені В.Є. Таїрова» НААН. Фітосанітарне обстеження виноградників та відбір зразків для дослідів проведено в Одеській, Миколаївській і Херсонській областях. У роботі використано клоновий матеріал технічних і столових сортів винограду. Відбір зразків виноградних рослин проведено за зовнішніми симптомами вірусних хвороб. Дослідження проведено з урахуванням кліматичних умов півдня України.

Відбір, зберігання і підготовку зразків рослин винограду проведено згідно зі стандартом ISO 16578:2013. Для виявлення вірусів у виноградних рослинах використовували метод ІФА-ELISA. Підготовку розчинів імуноглобулінів, кон'юганту і субстрату проводили згідно з інструкціями комерційних тест-наборів імуноферментного аналізу (Agritest, Італія). В якості субстрату використовували п-нітрофенілфосфат (Serva, Німеччина). Результати імуноферментного аналізу фіксували за допомогою імуноферментного аналізатора «Dynatec MR-600» (США) при оптичній щільності 406 нм. Для ідентифікації вірусів винограду використовували класичну полімеразну ланцюгову реакцію з гел-електрофоретичною детекцією і полімеразну ланцюгову реакцію у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Для проведення класичної полімеразної ланцюгової реакції було апробовано наступні пари праймерів: до вірусу скручування листя: першого серотипу (GLRaV1) – LR1hsp70-417F/LR1hsp70-737R, розмір продукту 320 п. н.; другого (GLRaV2) – LR2-L2/F/LR2-U2/R, розмір продукту 331 п. н.; третього (GLRaV3) – LC1/F/LC2/R, розмір продукту 546 п. н.; четвертого (GLRaV4) – LR4-HSPV/F/LR4-HSPC/R, розмір продукту 319 п. н.; п'ятого (GLRaV5) – LR5HSPV/F/LR5HSPC/R, розмір продукту 272 п. н.; дев'ятого (GLRaV9) – LR9-F/F/LR9-R/R, розмір продукту 393 п. н.; до вірусу коротковузля (GFLV) – GFLV V1/F/GFLV C1/R, розмір продукту 311 п. н.; до вірусу мармуровості (GFkV) – GFkV1/Fa/GFkC1/Ra, розмір продукту 344 п. н.; до вірусу А комплексу борознистості деревини винограду (GVA) –

GVA V1/F/GVA C1/R, розмір продукту 429 п. н.; до вірусу В комплексу борознистості деревини винограду (GVB) – GVB V1/F/GVB C1/R, розмір продукту 459 п. н. (Fatima Osmana, et al., 2008). Синтез праймерів було здійснено за замовленням (Fermentas, Литва, ЗАТ «Синтол», Російська Федерація). Позитивними контролями були: фрагменти кДНК ампліконів із чубуків виноградної лози та також позитивний біологічний матеріал із тест-наборів для імуноферментного аналізу, негативними контролями – деіонізована вода. Синтез кДНК із РНК рослинного матеріалу проводили в ході зворотної транскрипції з використанням набору «Реверта-Л» (ІнтерЛабСервіс, Російська Федерація) за допомогою програмуємого ДНК-ампліфікатора «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (НПО ДНК-Технологія, Російська Федерація). Для постановки реакції ензиматичної ампліфікації використовували 30–40 нг отриманої кДНК, а також відповідні праймери у концентрації 200 мкМ, дНТФ – 2,5 мМ, 2 од. Таq-полімерази. Кінцевий об'єм реакційної суміші складав 20 мкл. ПЛР-ампліфікацію, при кінцевій концентрації іонів магнію 2,5 мМ, проводили за допомогою термоциклеру «Терцик» ТП4-ПЦР-01 (НПО ДНК-Технологія, Російська Федерація) в режимі емуляції Ramp 1°C/сек з використанням наступної програми: попередня інкубація при 95 °С 2 хв, потім вісім циклів, кожен з яких включав денатурацію при 94 °С 30 сек., відпал праймерів при 59–55 °С (*touch-down* – 0,5 °С/цикл) 30 сек. та елонгацію при 72 °С 1 хв.; далі 30 циклів, кожен з яких включав денатурацію при 94 °С 30 сек., відпал праймерів при 55 °С 30 сек. та елонгацію при 72 °С 1 хв, з подальшим завершальним етапом елонгації при 72 °С 7 хв. Для проведення гель-електрофорезу використовували маркер довжини фрагментів 50–1000 п. н. (Fermentas, Литва). Виявлення ампліконів проводили методом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі (ТВЕ-буфер, етидія бромід) протягом 40 хв при напрузі електричного поля 5,2 В/см.

Для ідентифікації вірусів полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу використовували прямий і зворотний праймери і мічені зонди (ЗАТ «Синтол», Російська Федерація) згідно з методикою (Fatima Osmana et al., 2008). Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія). Накопичення флуоресцентного сигналу вимірювали по п'яти каналам відповідно: FAM/Green (470 нм/510 нм), JOE/Yellow/HEX (530 нм/555 нм), ROX/Orange (585 нм/610 нм), Cy5/Red (625 нм/660 нм) – для ідентифікації вірусів 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 секвенування продукти полімеразної ланцюгової реакції піддавалися очищенню за допомогою колонок GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific, USA). Секвенування ампліфікованих ділянок кДНК вірусу *GFLV* проводили за допомогою тест-набору Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) v. 3.1. Електрофорез зразків відбувався у ДНК-аналізаторі ABI PRISM 3500. Аналіз нуклеотидних

послідовностей мтДНК проводили за допомогою програми «Sequencing Analysis» (версія 5.4).

Діагностику вірусу А (*GVA*) комплексу борознистості деревини винограду проводили з використанням біосенсору – фотолюмінісцентної плівки ZnO, яка була синтезована в лабораторному ALD-реакторі (ALD-Atomic layer deposition – атомне пошарове осадження).

Усі математичні розрахунки проводили із використанням спеціальних математичних програм (Statistica 5.0, Excel, Non Linear) на комп'ютері. Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за параметричними критеріями нормального розподілу варіант. Стандартне відхилення середніх значень – за загальноприйнятою методикою за допомогою MS Excel (Лакин Г. Ф., 1980).

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**Візуальне обстеження виноградників півдня України.** Матеріал для дослідження було зібрано в умовах півдня України, а саме: в Одеській, Миколаївській і Херсонській областях. Були обстежені виноградні насадження різних клонів технічних і столових сортів на площі понад 300 га, з них: по Одеській області – 266 га, Миколаївській – 10 га, Херсонській – 10 га. Обстеження виноградних насаджень проводили з травня по жовтень. Було досліджено 24 найменування клонів технічних сортів винограду, десять найменувань клонів столових сортів винограду і три найменування клонів підщепних сортів.

У результаті фітосанітарного обстеження промислових виноградних насаджень півдня України було виявлено куці винограду сортів: Шардоне, Сухолиманський білий, Каберне Совіньйон з симптомами скручування листя винограду (рис. 1).



А



Б

Рис. 1. Куці винограду з симптомами скручування листя винограду: А – білоягідний сорт Сухолиманський білий; Б – червоноягідний сорт Каберне Совіньйон (Одеська область, 2016 р.)

На деяких рослинах сорту Каберне Совіньйон було виявлено симптоми коротковузля (рис. 2).



Рис. 2. Симптоми коротковузля винограду, сорт Каберне Совіньйон (Миколаївська область, 2012 р.)

На рослинах сорту Шардоне в Одеській області було виявлено симптоми вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду (рис. 3).



А



Б

Рис. 3. Симптоми вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду: А – на штабмі; Б – на листі, сорт Шардоне (Одеська область, 2016 р.)

За період з 2010 по 2018 р. було обстежено понад 4000 кущів щорічно, з них частіше зустрічалися виноградні рослини з симптомами скручування листя і коротковузля (табл. 1) і спостерігалось збільшення виноградних кущів з симптомами вірусних хвороб винограду.

Таблиця 1

**Результати фітосанітарного обстеження виноградників  
в господарствах півдня України (2010–2018 рр.)**

Господарство	Вірус винограду			
	<i>GLRaV</i>	<i>GFLV</i>	<i>GVB</i>	<i>GVA</i>
Кількість рослин з симптомами хвороб, %				
Одеська область	19,17	4,4	0,14	–
Миколаївська область	2,03	0,63	–	–
Херсонська область	1,58	0,22	–	–

Примітка. «–» – не виявлено

Як видно з табл. 1, симптоми вірусних хвороб в більшому ступені було виявлено на виноградниках в Одеській області.

У результаті щорічного обстеження виноградних насаджень господарств півдня України за період з 2010 до 2018 р. спостерігали динаміку збільшення виноградних кущів з симптомами вірусних хвороб винограду (табл. 2).

Таблиця 2

**Результати фітосанітарного обстеження виноградників  
на наявність симптомів вірусних хвороб виноградних рослин  
(Одеська область, 2010–2018 рр.)**

Рік	Вірус винограду, кількість кущів з симптомами хвороб, %			
	<i>GLRaV</i>	<i>GFLV</i>	<i>GVB</i>	<i>GVA</i>
2010	7,92	2,16	–	–
2011	8,10	2,39	–	–
2012	9,23	2,66	–	–
2013	8,55	2,93	–	–
2014	9,00	3,51	0,09	–
2015	9,45	3,02	–	–
2016	10,35	3,15	0,05	–
2017	12,15	3,37	0,05	–
2018	12,15	3,37	0,05	–

Примітка. «–» – не виявлено

Як видно із табл. 2, найбільший відсоток кущів з симптомами вірусів скручування листя і коротковузля спостерігався з 2016 по 2018 р. Причиною цього, ймовірно, був заражений садивний матеріал і погодні умови, які сприяли прояву симптомів вірусних хвороб виноградних рослин. Симптоми прояву вірусних хвороб є першим кроком для діагностики, але ці ознаки не завжди відповідають наявності вірусу в цих рослинах.

**Діагностика вірусних хвороб винограду.** Візуальний фітосанітарний контроль не дозволяє виявити виноградні кущі, уражені прихованою вірусною інфекцією. При цьому у процесі заготівлі лози для виробництва щеплених саджанців відбувається поширення зараженого матеріалу при вегетативному розмноженні рослин.

Дослідження було спрямовано на з'ясування, чи завжди симптоми вірусних хвороб виноградних рослин пов'язані з наявністю вірусу в цих рослинах. Накопичення вірусу коливається протягом всього вегетаційного періоду від максимального до мінімального в різних ділянках рослини.

Методом імуноферментного аналізу підтверджено, що для виявлення вірусу коротковузля, скручування листя, вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду найкращим матеріалом є зіскрібки кортикального шару чубуків лози винограду та листя (табл. 3).

Ідентифікацію вірусів методом імуноферментного аналізу проводили у відібраних рослин винограду з характерними симптомами, лозу яких використовували для виробництва здорового сертифікованого клонового матеріалу. Встановлено, що серед досліджених виноградних рослин з

симптомами вірусних хвороб не всі рослини з цією ознакою мали ураження відповідними вірусами (рис. 4).

Таблиця 3

**Встановлення концентрації вірусів винограду  
в різних ділянках рослин методом імуноферментного аналізу  
за результатами детекції оптичної щільності**

Вірус винограду	Концентрація вірусів винограду в різних частинах винограду (оптична щільність, OD <sub>405</sub> )					
	листя	жилки	молоді пагони	чубуки лози	вусики	ягоди
<i>GFLV</i>	0,967	0,99	0,690	1,218	0,749	0,475
<i>GLRaV</i>	0,577	0,645	0,723	0,870	–	0,632
<i>GVB</i>	0,607	0,629	0,703	0,945	–	0,450

Примітка. «–» – не виявлено

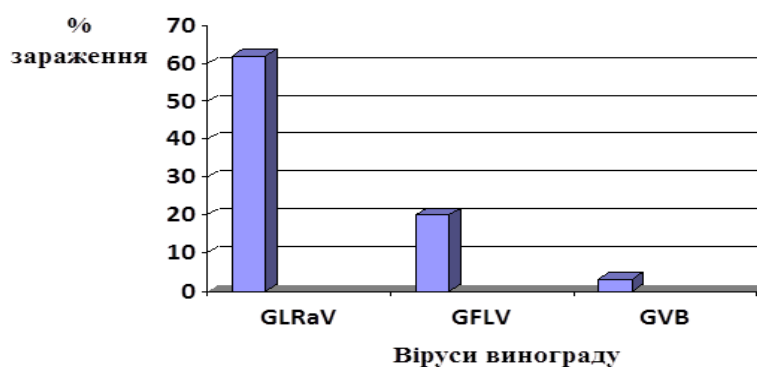


Рис. 4. Виявлення зараженості виноградних рослин вірусами винограду методом імуноферментного аналізу (Одеська область, 2016 р.)

Як видно із рис. 4, найбільший відсоток ураженості вірусами винограду припадає на вірус скручування листя, на другому місці за ураженістю знаходиться вірус коротковузля і на третьому – вірус Б комплексу борознистості деревини винограду. Вірус мармуровості винограду методом імуноферментного аналізу не було ідентифіковано в досліджених виноградних рослинах.

Для діагностики вірусних хвороб та ідентифікації вірусів виноградних рослин з симптомами і латентно заражених, використовували метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією з гелелектрофоретичною і гібридаційно-флуоресцентною детекцією у форматі реального часу.

Досліджували різні об'єми зразку, а саме 1,0 мкл, 1,5, 2,0, 2,5 мкл, концентрацію іонів Mg<sup>2+</sup>, а саме в межах 1,0–3,0 мМ (рис. 5) і залежність інтенсивності сигналу флуоресценції від температури відпалу праймерів для детекції вірусів (рис. 6).

Випробувань різних концентрацій Mg<sup>2+</sup> показало, що крива флуоресцентного сигналу була більш оптимальною при концентраціях MgCl<sub>2</sub> 3,0–2,5 мМ (див. рис. 5), температурі відпалу 48–50 °С (рис. 6), об'єму зразка – 2 мкл і об'єму реакційної суміші – 18 мкл.

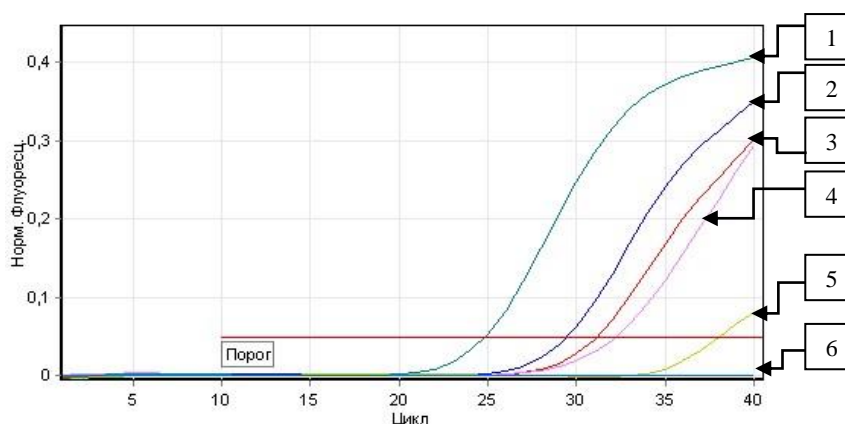


Рис. 5. Залежність інтенсивності сигналу флуоресценції *GLRaV* від концентрації  $MgCl_2$  в реакційній суміші: 1 – 3,0 мМ; 2 – 2,5 мМ; 3 – 2,0 мМ; 4 – 1,5 мМ; 5 – 1,0 мМ; 6 – негативний контрольний зразок

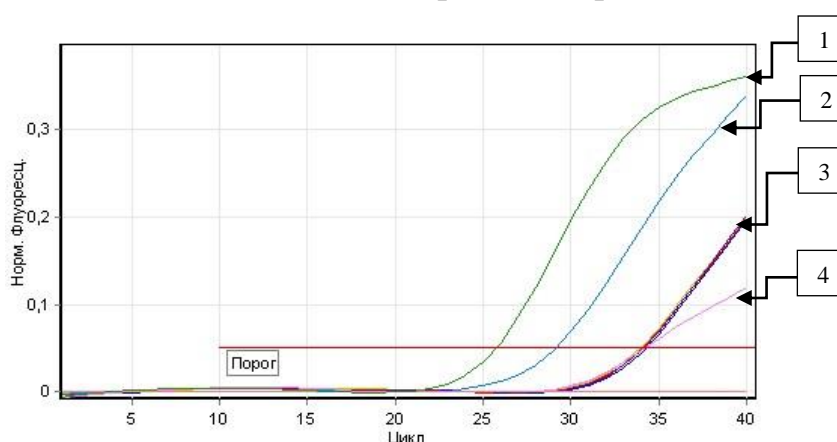


Рис. 6. Залежність інтенсивності сигналу флуоресценції від температури відпалу праймерів для детекції вірусу *GLRaV*: 1 – 50 °C; 2 – 48 °C; 3 – 45 °C; 4 – 40 °C

У результаті проведення полімеразної ланцюгової реакції із зразками клонового матеріалу різних сортів винограду, які мали симптоми зараженості, було ідентифіковано вірус скручування листя винограду детекцією електрофорезом (рис. 7) і флуоресцентною (рис. 8).

Методом полімеразної ланцюгової реакції було ідентифіковано вірус коротковузля винограду в клоновому матеріалі сортів Сухолиманський білий, Каберне Фран і Трамінер рожевий, який не було ідентифіковано методом імуноферментного аналізу (рис. 9, 10).

У рослинах винограду сортів Сухолиманський білий, Піно Грі і Піно нуар було ідентифіковано вірус Б комплексу борознистості деревини винограду (рис. 11, 12).

Метод полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією дозволяє проводити ідентифікацію вірусів винограду у високостандартизованому форматі без електрофоретичної обробки ампліконів. При цьому ризик похиби результатів знижується, зводиться до мінімуму ризик контамінації. Автоматичний облік результатів дозволяє виключити суб'єктивні помилки при інтерпретації отриманих даних.

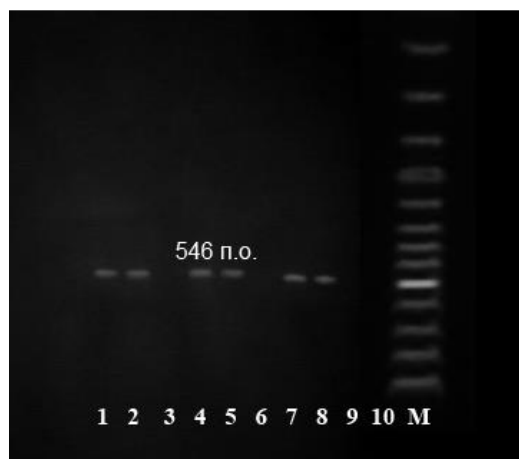


Рис. 7. Електрофореграма продуктів ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією вірусу скручування листя третього серотипу: 1, 2 – позитивні зразки сорту Шардоне; 4 – позитивний зразок сорту Сухолиманський білий; 5 – позитивний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія; 7, 8 – позитивні зразки сорту Іршаї Олівер; 3, 6 – негативний контроль ( $H_2O_{деіон}$ ); 9, 10 – негативні зразки сорту Шардоне; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

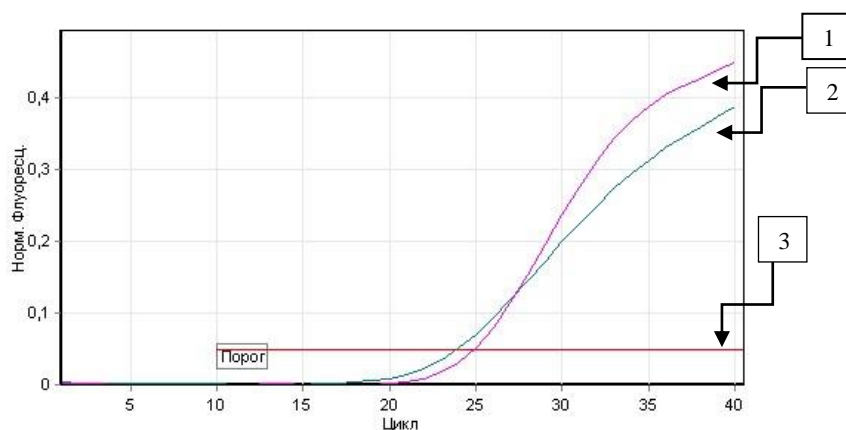


Рис. 8. Детекція вірусу скручування листя винограду методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу: 1 – позитивний контрольний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія; 2 – вірус скручування листя в рослині сорту Іршаї Олівер; 3 – негативний контрольний зразок

Результати ідентифікації вірусів методом полімеразної ланцюгової реакції в форматі гель-електрофорезу і результати, отримані методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу, які відображено в табл. 4, повністю корелюють. Але метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу є більш ефективним і точним, тому, що виключає стадію електрофорезу. У результаті порівняння ідентифікацію вірусів винограду різними методами, а саме: методом імуноферментного аналізу і методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією з двома типами детекції встановлено, що найбільш

ефективним і вірогідним є метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією (табл. 4).

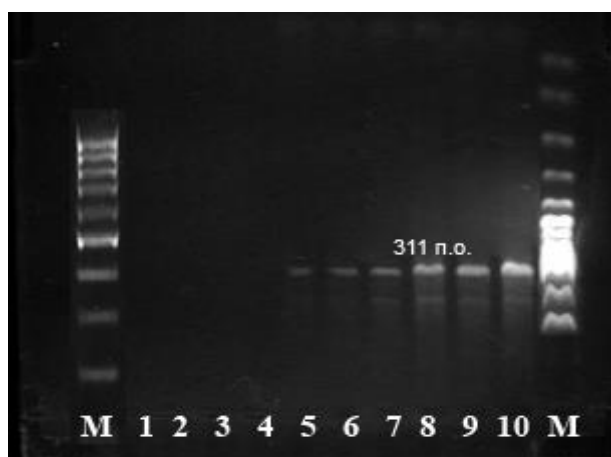


Рис. 9. Електрофореграма продуктів ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією вірусу коротковузля: 1, 2 – негативний контроль ( $H_2O_{\text{деіон}}$ ); 3, 4 – негативні зразки сорту Шардоне; 5, 6 – позитивні зразки сорту Сухолиманський білий; 7 – позитивний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія; 8 – позитивний зразок сорту Трамінер рожевий; 9 – позитивний зразок сорту Одеський чорний; 10 – позитивний зразок сорту Каберне Фран; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Thermo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

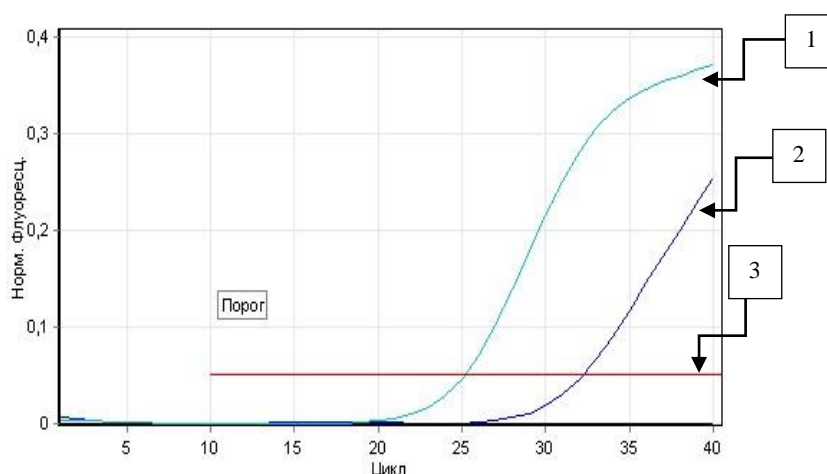


Рис. 10. Детекція вірусу коротковузля винограду методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу: 1 – вірус коротковузля в рослинах сорту Каберне Фран; 2 – позитивний контрольний зразок; 3 – негативний контрольний зразок

Як видно з табл. 4, віруси скручування листа першого і третього серотипів не було ідентифіковано методом імуноферментного аналізу в виноградних рослинах сортів: Іршаї Олівер, клон 3524; Шардоне, клон 4876; Шардоне, клон 277, у той час, як вони були ідентифіковані методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у форматі гелелектрофорезу і в режимі реального часу з флуоресцентною детекцією.



Рис. 11. Електрофореграма продуктів ампліфікації полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією вірусу Б: 1, 2 – негативний контроль ( $H_2O_{деіон}$ ); 3 – негативний зразок сорту Шардоне; 4 – позитивний зразок сорту Піно Грі; 5 – позитивний зразок з комерційного тест-набору Agritest, Італія; 6, 7 – негативний зразок сорту Каберне Совіньйон; 8 – негативний зразок сорту Шардоне; 9, 10 – негативні зразки сорту Мерло; М – маркер довжини фрагментів ДНК 50–1000 п. н. (*Termo Scientific O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder*)

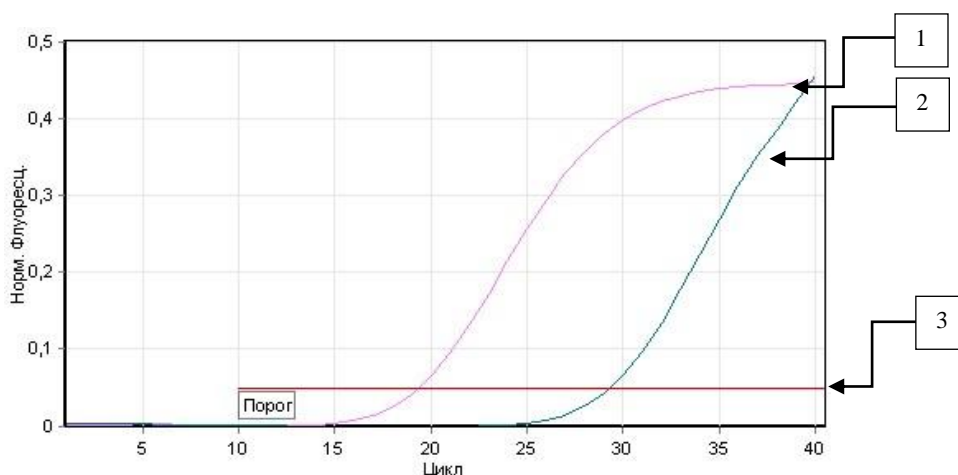


Рис. 12. Детекція вірусу комплексу борознистості деревини винограду методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу: 1 – вірус Б комплексу борознистості деревини винограду в рослинах сорту Шардоне; 2 – позитивний контрольний зразок; 3 – негативний контрольний зразок

Вірус коротковузля винограду не було визначено методом імуноферментного аналізу в виноградних рослинах сортів: Аліготе, клон 263; Сухолиманський білий, клон 244; Шардоне, клон 4876, а було ідентифіковано методом полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у форматі гель-електрофорезу і у режимі реального часу. Вірус Б комплексу борознистості деревини винограду було виявлено методом полімеразної ланцюгової реакції в рослинах сортів: Піно Грі, клон FR49-207; Піно нуар, клон 667; Сухолиманський білий, клон 244, у той час, як методом імуноферментного аналізу цей вірус не було ідентифіковано.

## Порівняльний аналіз результатів ідентифікації вірусів винограду технічних і столових сортів винограду

## з симптомами різними методами

№ з/п	Сорт, клон винограду	GLRaV (I, 3)						GFLV			GVV		
		ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР	ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР	ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР	ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР
1.	Аліготе, клон 263	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
2.	Іршаї Олівер, клон 3524	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	Каберне Совінйон, клон VCR8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	Каберне Совінйон, клон 169	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.	Каберне Совінйон, клон 2043	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	Каберне Совінйон, клон 15	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	Каберне Совінйон, клон 2043	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8.	Каберне Фран, клон ISV101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	Каберне Фран, клон VCR10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10.	Мерло, клон VCR13	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11.	Одеський чорний, клон 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
12.	Піно білий, клон VCR5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13.	Піно Грі, клон FR49-207	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
14.	Піно нуар, клон 667	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
15.	Рислінг рейнський, клон 13101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16.	Рислінг рейнський, клон 2071	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17.	Совінйон зелений, клон 4442	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Продовження табл. 4

№ з/п	Сорт, клон винограду	GLRaV (1, 3)			GFLV			GVV		
		ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР	ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР	ІФА	ЗТ-ПЛР	РЧ-ПЛР
18.	Суходолманський білий, клон 244	+	+	+	-	+	+	-	-	-
19.	Суходолманський білий, клон 244	-	+	+	-	-	-	-	+	+
20.	Суходолманський білий, клон 1632	-	+	+	-	-	-	-	-	-
21.	Тельгі курук, клон 7131	-	-	-	+	+	+	-	-	-
22.	Трамнер рожевий, клон 3360	-	-	-	+	+	+	-	-	-
23.	Шардоне, клон 4876	-	+	+	-	-	-	-	-	-
24.	Шардоне, клон 4876	+	+	+	-	+	+	-	-	-
25.	Шардоне, клон 96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26.	Шардоне, клон 96	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27.	Шардоне, клон 96	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28.	Шардоне, клон 95	+	+	+	-	-	-	-	-	-
29.	Шардоне, клон 76	+	+	+	-	-	-	-	-	-
30.	Шардоне, клон 130	-	-	-	-	-	-	+	+	+
31.	Шардоне, клон 548	+	+	+	+	+	+	-	-	-
32.	Шардоне, клон 277	-	+	+	-	-	-	-	-	-
33.	Італія, клон АЗОС	+	+	+	-	-	-	-	-	-
34.	Одеський сувенір, клон 8022	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Примітка. ІФА – імуноферментний аналіз; ЗТ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція із зворотною транскрипцією; РЧ-ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі; «+» – виявлено; «-» – не виявлено

Таким чином, незважаючи на те, що метод імуноферментного аналізу є високочутливим, швидким і об'єктивним, але не завжди ним можна виявити віруси. Метод полімеразної ланцюгової реакції при ідентифікації вірусів у виноградних рослинах виявився переважними, у порівнянні з методом імуноферментного аналізу, і більш чутливим. Всі методи діагностики, а саме метод імуноферментного аналізу і метод полімеразної ланцюгової реакції, ефективні тільки в певні періоди розвитку рослин. Тому найбільш об'єктивна і точна діагностика й ідентифікація вірусів винограду можлива при комплексному використанні всіх методів діагностики: полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу.

Метод полімеразної ланцюгової реакції у мультиплексному форматі, як з флуоресцентною детекцією, так і гель-електрофорезом, дозволяє ідентифікувати відразу декілька вірусів винограду з використанням великої кількості унікальних праймерів в одній полімеразній ланцюговій реакції.

Така полімеразна ланцюгова реакція замінює кілька окремих реакцій, які вимагали б більшої кількості реагентів і часу. Температури відпалу кожного з наборів праймерів і зондів бути оптимізовані в рамках однієї реакції (рис. 13).

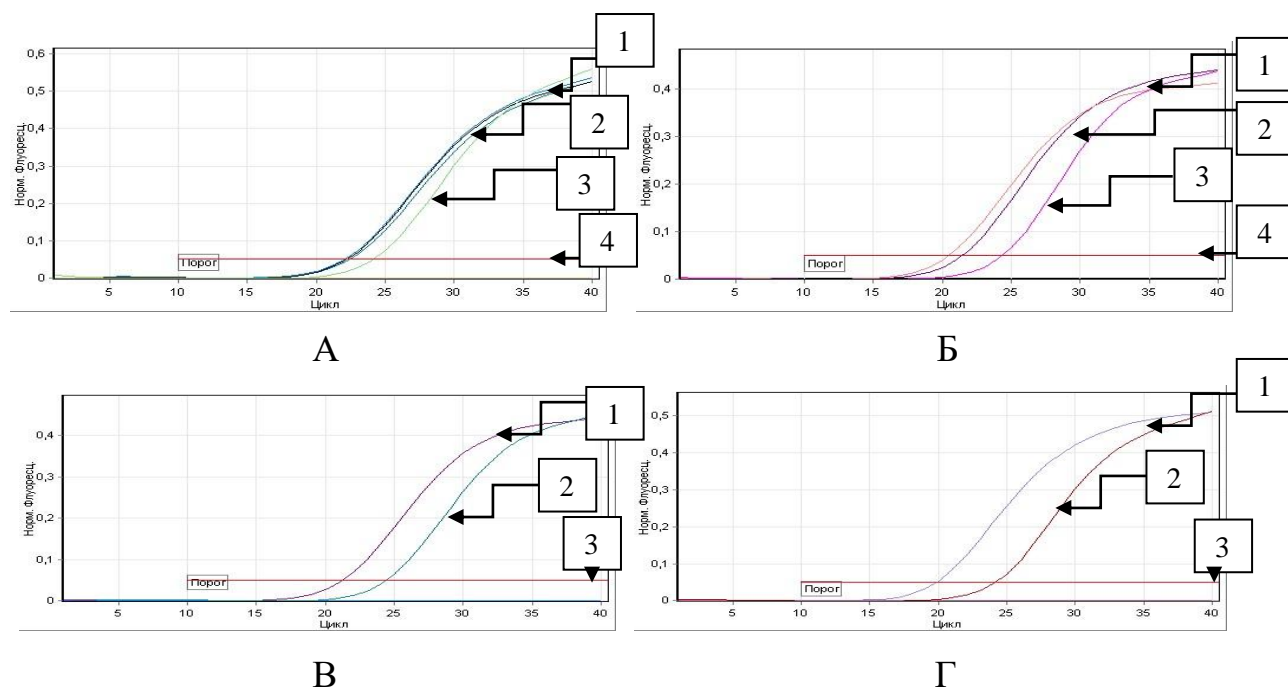


Рис. 13. Ідентифікація вірусів винограду методом мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції: А – *GLRaV1* (FAM/Green); Б – *GLRaV3* (JOE/Yellow/HEX); В – *GFLV* (ROX/Orange); Г – *GVB* (Cy5/Red); 1 – вірус; 2 – позитивний контрольний зразок; 3 – негативний контрольний зразок

Як видно із рис. 13, цим методом було ідентифіковано: вірус скручування листя і коротковузля в рослинах винограду сорту Каберне Совіньйон; вірус Б комплексу борознистості деревини винограду в рослинах сорту Шардоне, клон 130.

Метод мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції валідовано до ізолятів вірусів виноградної лози, дозволяє детектувати відразу декілька вірусів

винограду. При цьому відсутність стадії електрофорезу знижує ризик контамінації і суттєво підвищує специфічність реакції.

Для ідентифікації вірусу коротковузля виноградної лози, виявленого на сорті Каберне Совіньйон клонового походження в Одеській області, проводили порівняння секвенованих послідовностей фрагменту гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> по міжнародній базі даних NCBI GenBank із ізолятами вірусу коротковузля, що мали схожі нуклеотидні послідовності вірусів винограду, виявлених в інших країнах (рис. 14).

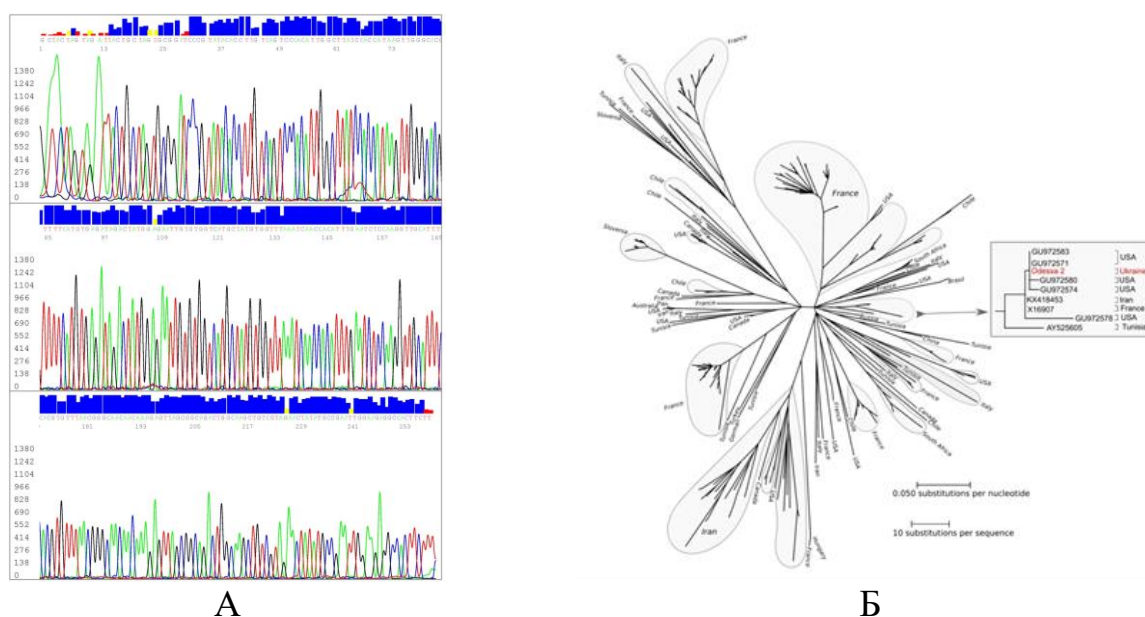


Рис. 14. А – нуклеотидна послідовність фрагменту гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> *GFLV*, виявленого у зразку сорту Каберне Совіньйон клонового походження (Одеська область, 2018 р.); Б – дендрограма, побудована з використанням методу пошуку максимальної правдоподібності по фрагменту послідовності гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> *GFLV* (282 п. н.). Довжина гілок дендрограми відображає число заміни нуклеотидів між вузлами. Написи позначають місця збору зразків. Гілка дендрограми, до якої віднесено вірус коротковузля виноградної лози, який було ідентифіковано із зразків сорту Каберне Совіньйон (Одеська область), додатково відображено у виносці

У ході наступного аналізу еволюційних відношень виявленого вірусу коротковузля по фрагменту нуклеотидної послідовності гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> (див. рис. 14) проведено оцінку генетичних відстаней з використанням моделі заміни *GTR* з гама-розподілом частоти заміни ( $\alpha=0,6785$ ) і допущенням наявності еволюційних незмінних сайтів (25,79 % сайтів).

З дендрограми видно, що визначена в зразку послідовність дуже близька до зразків із географічно віддалених від України районів. Ідентифікована в зразку винограду сорту Каберне Совіньйон (Одеська область) нуклеотидна послідовність вірусу *GFLV* кластеризується з нуклеотидними послідовностями вірусів коротковузля, виділених із рослин винограду сортів Каберне Совіньйон і Цинфандель із Каліфорнії, США (GU972583, GU972571, GU972574, GU972580). Незначні відмінності з ідентифікованою нуклеотидною

послідовністю демонстрували також зразки з Ірану (КХ418453) і Франції (X16907). Слід зазначити, що нуклеотидна послідовність вірусу коротковузля із Франції (X16907) була анотована в базі NCBI GenBank ще в 1989 р.

В результаті фітосанітарного обстеження виноградників в Одеській області було виявлено кущі винограду сорту Одеський чорний, клон 11 з симптомами скручування листя (рис. 15).



Рис. 15. Кущ винограду сорт Одеський чорний, клон 11 з симптомами вірусу скручування листя (Одеська область, 2017 р.)

Для ідентифікації вірусу скручування листя винограду проводили скринінг методом полімеразної ланцюгової реакції по різних парах праймерів (Fatima Osama et al. 2008). У результаті проведення полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією до різних серотипів вірусу скручування листя встановлено, що збудником цієї хвороби виявився дев'ятий серотип вірусу скручування листя винограду, розмір продукту ампліфікації 393 п. о. (рис. 16).

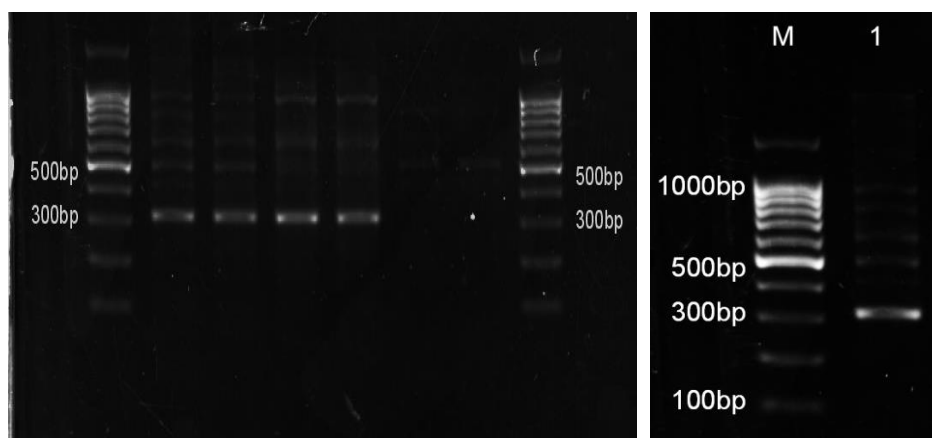


Рис. 16. Електрофореграма фрагменту кДНК вірусу скручування листя дев'ятого серотипу (*GLRaV9*). Маркер довжини фрагментів ДНК 100–1000 п. н. (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder*)

У результаті проведення скринінгу по всім парам праймерів до різних серотипів вірусу скручування було встановлено, що виявлений вірус скручування відноситься до дев'ятого серотипу. Раніше цей серотип у південному регіоні України не ідентифікувався.

Було запропоновано новий чутливий оптичний біосенсор, оснований на ALD-технології (Atomic layer deposition) для визначення вірусу А комплексу борознистості деревини винограду (Adib Abou Chaaya et al., 2013). За аналізом змін спектрів фотолюмінесценції в результаті адсорбції біологічних молекул було вдосконалено структуру зразка (Si/ZnO/anti-GVA) за рахунок змін параметрів в процесі ALD-синтезу наноструктурованої поверхні ZnO-сенсору. У результаті модифікацій поверхні сенсору була досягнута більш ефективна іммобілізація і висока точність детектування аналіту.

Показано, що сформовані таким чином плівки на основі ZnO мають сприятливі поверхнево-структурні властивості для прямої іммобілізації антитіл компліментарних до GVA-антигенів. Спільно з колегами кафедри експериментальної фізики Одеського національного університету імені І. І. Мечникова було вивчено оптичні, структурні та адсорбційні властивості наноструктурованих тонких плівок ZnO для розроблення високочутливого оптичного імуносенсору для ідентифікації вірусу А винограду. Виявлення антигенів GVA оцінювали за змінами фотолюмінесценції, що було приблизно на рівні 425 нм (рис. 17). Оптичні властивості плівок ZnO вперше застосовано для виявлення антигенів вірусу А комплексу борознистості деревини винограду та ідентифіковано за допомогою комплементарних антитіл, попередньо іммобілізованих на поверхні наноструктурованих плівок ZnO.

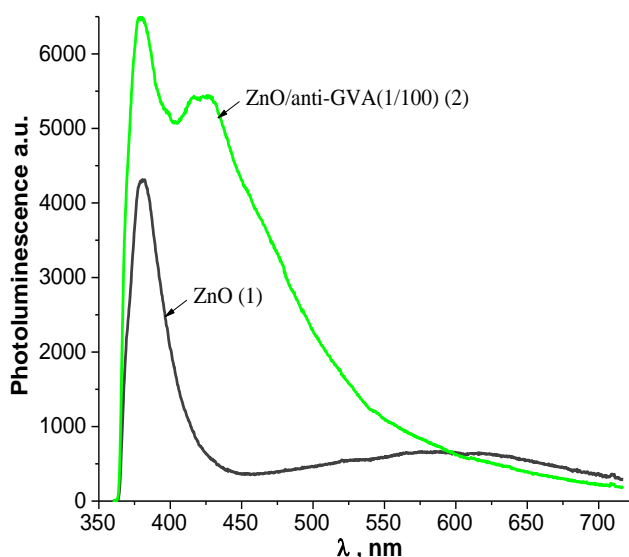


Рис. 17. Спектри фотолюмінесценції ZnO та ZnO, функціоналізовані антитілами до вірусу GVA (розбавлення 1/100 основного розчину антитіл)

Завдяки високій продуктивності та простоті розробленого імуносенсора ZnO, модифіковані ALD-плівки можуть бути застосовані для розроблення інших імунодатчиків на основі іммобілізованих антитіл, які будуть чутливі до вибраного аналіту.

## ВИСНОВКИ

Дисертацію присвячено дослідженню виявлення вірусів винограду на виноградниках півдня України, що входять до системи санітарної сертифікації садивного матеріалу. Дослідження проводилися молекулярно-біологічними і серологічними методами діагностики та порівняння результатів для оцінки санітарного стану базових маточників винограду у виноградарських розсадниках України. На підставі проведених експериментальних досліджень встановлено:

1. Фітосанітарним обстеженням виноградних насаджень Одеської, Миколаївської і Херсонської областей встановлено наявність вірусних хвороб винограду, що контролюються згідно європейської системи отримання сертифікованого садивного матеріалу. Встановлено, що серед уражених рослин 70 % становить скручування листя винограду, 20 % коротковузля винограду і 10 % вірус Б комплексу борознистості деревини (*rugose wood complex*).

2. Удосконалено та вперше в Україні валідовано метод полімеразної ланцюгової реакції та ідентифікації вірусів винограду із використанням українських ізолятів у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Метод виявився більш чутливим, ніж передбачене стандартом ЕРРО обов'язкового тестування за допомогою імуноферментного аналізу та дозволяє виявити на 35 % більше латентно уражених вірусами рослин.

3. Для ідентифікації вірусних ізолятів виноградних рослин удосконалено та запропоновано метод полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією у режимі реального часу з флуоресцентною детекцією і мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію. Підібрано та рекомендовано умови проведення реакції: об'єм реакційної суміші – 18 мкл; концентрація  $MgCl_2$  – в межах 3,0–2,5 мМ; оптимальна температура відпалу для ідентифікації вірусу *GLRaV* –  $T_{від.}=50\text{ }^{\circ}C$ ,  $T_{від.}=54\text{ }^{\circ}C$  – для вірусу *GFLV*,  $T_{від.}=52\text{ }^{\circ}C$  – для вірусу *GVB*.

4. Вперше запропоновано використання біосенсору ZnO (ALD-технологія), який полягає у зміні спектрів фотолюмінесценції при адсорбції біологічних молекул для ідентифікації вірусу А комплексу борознистості деревини винограду.

5. Методами імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією виявлено наявність збудників вірусних хвороб винограду: скручування листя винограду, коротковузля винограду, вірусами А і Б комплексу борознистості деревини винограду, як у рослинах винограду із симптомами вірусних хвороб, так і у безсимптомних рослинах сортів і клонів винограду, це свідчить про необхідність обов'язкового включення лабораторного тестування до схеми санітарного контролю маточних рослин і садивного матеріалу винограду в Україні.

6. За діагностичними ознаками хворих рослин та з використанням полімеразної ланцюгової реакції вперше виявлено наявність в агроценозах півдня України дев'ятого серотипу вірусу скручування листя винограду, що

свідчить про доцільність його включення до схеми санітарного контролю в Україні із застосуванням візуальної санітарної селекції та детекції полімеразною ланцюговою реакцією.

7. Серед 35 столових і технічних прищепних сортів винограду найбільш сприйнятливий до вірусної інфекції виявився технічний сорт Каберне Совіньйон. На ньому було виявлено комплекс збудників хвороб, що спричиняють ураження скручування листків винограду, коротковузля винограду. Максимальна ступінь ураження вірусом скручування становить 4 %, вірусом коротковузля – 7 %.

8. До найменш уражених відносяться сорти: Аліготе (2 %), Іршаї Олівер (2 %), Мерло (1 %), Одеський чорний (2–4 %), Піно білий (1 %), Піно грі (1–2 %), Піно нуар (2 %), Рислінг рейнський (3 %), Совіньйон зелений (6 %), Сухолиманський білий (2–7 %), Тельті курук (1 %), Трамінер рожевий (1 %), Шардоне (1–7 %), Італія (2 %), Одеський сувенір (3 %). На сортах Голубок, Сурученський білий, Мускат жовтий, Мускат білий, Мускат одеський, Мускат Оттонель, Рубін таїровський, Совіньйон білий, Фетяска біла, Мечта, Восторг, Ланка, Кобзар, Королева виноградників, Мускат гамбургський, Мускат янтарний, Оригінал, Мускат Адда вірусних хвороб винограду в районі проведення досліджень не виявлено.

9. У рослинах винограду сорту Каберне Совіньйон в Одеській області ідентифікували нуклеотидну послідовність вірусу коротковузля, яка кластеризується з послідовністю нуклеотидів вірусу коротковузля, виділених із рослин сортів Каберне Совіньйон і Цинфандель із Каліфорнії, США (GU972583, GU972571, GU972574, GU972580).

## **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Для господарств, які займаються вирощуванням сертифікованих саджанців, рекомендується відбирати візуально здоровий матеріал. Для цього, насамперед, слід проводити фітосанітарне обстеження виноградних плантацій в весняно-літній період, коли проявляються симптоми вірусних хвороб.

При придбанні великої кількості садивного матеріалу, а також при виробництві сертифікованого садивного матеріалу, доцільно передбачати попереднє тестування рослин на наявність латентної форми вірусної інфекції з використанням методів імуноферментного аналізу та полімеразної ланцюгової реакції.

Для діагностики вірусних хвороб винограду рекомендується використовувати розроблену систему мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції в наукових установах, в лабораторіях карантинних служб для контролю фітосанітарного стану виноградників, а також з метою скорочення терміну діагностики.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

## Розділ монографії

1. Конуп Л. А., Мулюкіна Н. А., **Конуп А. И.**, Чистякова В. Л., Николаева Н. И. Виноград. Объекты системы санитарной сертификации (вирусы, бактерии, фитоплазмы). Под редакцией академика НААН, доктора сельскохозяйственных наук В. В. Власова. Одесса, 2018. С. 315–359. *(Здобувачем опрацьовано методику ідентифікації вірусів винограду).*

Статті у наукових фахових виданнях України,  
включених до міжнародних наукометричних баз даних:

2. **Конуп А. І.**, Чистякова В. Л., Конуп Л. О. Вірусні і фітоплазмові хвороби винограду. Діагностика. Біоресурси і природокористування. 2014. № 3–4. Т. 6. С. 77–80. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, узагальнено експериментальні дані).*

3. **Конуп А. І.**, Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О. Виявлення вірусу скручування листя винограду і поширення його на виноградниках півдня України. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2019. № 1 (77). Режим доступу до статті: <http://www.journals.nubip.edu.ua/index.php/Dopovidi>. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано експериментальні дані, написано статтю).*

4. Конуп А. І. Ідентифікація вірусів, збудників вірусних хвороб виноградних рослин. Біоресурси і природокористування. 2019. № 1–2. Т. 11. С. 5–13. *(Здобувачем отримано й узагальнено експериментальні дані, написано статтю).*

5. **Конуп А. І.**, Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Конуп Л. О. Виявлення і ідентифікація вірусу скручування листя виноградної лози на виноградниках Одеської області. Карантин і захист рослин. 2019. № 3–4 (254). С. 13–16. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, узагальнено експериментальні дані).*

6. **Конуп А. І.**, Мулюкіна Н. А., Конуп Л. О. Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб виноградних рослин на виноградниках Одеської області та їхня діагностика. Вісник аграрної науки. 2019. № 4. С. 24–29. *(Здобувачем отримано експериментальні дані, написано статтю).*

## Стаття у науковому виданні іншої держави

7. Tereshchenko Alla, Viktoriia Fedorenko, Smyntyna Valentyn, Konup Igor, Erikssone Martin, **Konup Anastasia**, Yakimova Rositsa, Ramanavicius Arunas, Balmeb Sebastien, Bachelany Mikhael. ZnO films formed by atomic layer deposition as an optical biosensor platform for the detection of Grapevine Virus A-type proteins. Biosensors and Bioelectronics. 2017. Vol. 92. P. 763–769. *(Здобувачем проведено узагальнення результатів).*

**Статті в інших наукових виданнях:**

8. Конуп Л. О., Щербина А. В., Чистякова В. Л., **Конуп А. І.** Вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду на півдні України. Виноградарство і виноробство. 2011. № 48. С. 92–95. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано експериментальні дані).*

9. Конуп Л. О., Чистякова В. Л., **Конуп А. І.**, Ніколаєва Н. І. Вдосконалення заходів щодо захисту винограду від системних хвороб з метою здійснення фітосанітарного контролю за станом насаджень винограду. Виноградарство і виноробство. 2014. № 51. С. 154–156. *(Здобувачем отримано й узагальнено експериментальні дані).*

**Тези наукових доповідей:**

10. **Конуп А. І.**, Чистякова В. Л., Ніколаєва Н. І., Щербина А. В., Конуп Л. О., Мулюкіна Н. А. Бактеріальні, вірусні і фітоплазмові хвороби винограду на півдні України. XII з'їзд товариства мікробіологів України імені С. М. Виноградського, м. Ужгород, 25–30 травня 2009 року: тези доповіді. Ужгород, 2009. С. 307. *(Здобувачем отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

11. **Конуп А. І.**, Мілкус Б. Н. Вірусні хвороби винограду і методи діагностики. Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: IV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, м. Сколе, 1–4 червня 2010 року: тези доповіді. Сколе, 2010. С. 248–251. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

12. Конуп Л. О., Мулюкіна Н. А., Чистякова В. Л., **Конуп А. І.**, Щербина А. В. Фітосанітарний стан виноградних насаджень півдня України. Сучасна біотехнологія сільськогосподарських рослин і біобезпека: VI Міжнародна науково-практична конференція, Геном рослин VI, м. Одеса, 7–10 вересня 2010 року: тези доповіді. Одеса, 2010. С. 21. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

13. Мілкус Б. Н., **Конуп А. І.** Діагностика вірусів винограду в імпортованих саджанцях. Фітосанітарна безпека та біоекологія застосування пестицидів: Всеукраїнська конференція, м. Чернівці, 14–17 вересня 2010 року: тези доповіді. Чернівці – Бояни, 2010. С. 247–250. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано експериментальні дані, написано тези).*

14. **Конуп А. І.**, Мілкус Б. Н. Виявлення вірусів скручування листя винограду і коротковузля при виробництві сертифікованого садивного матеріалу. Екологічні проблеми сільськогосподарського виробництва: V Всеукраїнська науково-практична конференція молодих учених, м. Яремче, 21–24 червня 2011 року: тези доповіді. Яремче, 2011. С. 162–163. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

15. **Конуп А. І.**, Мілкус Б. Н., Конуп Л. А. Виявление вирусом скручивания листьев и короткоузлия в процессе производства

сертифицированного посадочного материала винограда. Интегрированная защита растений: стратегия и тактика: Международная научно-практическая конференция, посвященная 40-летию со дня организации РУП «Институт защиты растений», г. Минск, Республика Беларусь, 5–8 июля 2011 года: тезисы доклада. Минск, 2011. С. 532–535. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

16. **Конуп А. І.**, Чистякова В. Л., Щербина А. В., Конуп Л. О. Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб на столових сортах винограду. Інноваційні технології в розвитку столового виноградарства: Міжнародна науково-практична конференція молодих учених і спеціалістів, м. Одеса, 30 серпня 2011 року: тези доповіді. Одеса, 2011. С. 109–112. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

17. Vlasov V., **Конуп А.**, Konup L., Chistyakova V. Identification of causes of diseases of grapes by Elisa and PCR. Proceedings of the 17<sup>th</sup> ICVG Meeting, Davis, California, USA, 7–11 October 2012: book of abstracts. Davis, 2012. P. 250–251. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

18. Власов В. В., Конуп Л. О., Чистякова В. Л., **Конуп А. І.** Виявлення вірусних, бактеріальних і фітоплазмових хвороб винограду на півдні України. Aktualne problemy w współczesnej nauce: Міжнародна конференція, м. Варшава, Республіка Польща, 28–30 червня 2013 року: тези доповіді. Варшава, 2013. С. 6–8. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

19. Konup A. Viruses, Bacterial and Phytoplasma Diseases of Grapevine in South of Ukraine. Actual Problems of Microbiology and Biotechnology: Міжнародна конференція для молодих учених, м. Одеса, 1–4 червня 2015 року: тези доповіді. Одеса, 2015. С. 63. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

20. Vlasov V., Konup L., **Конуп А.**, Chistyakova V. Grapevine virus diseases testing in the seedlings introduced to Ukraine. Proceedings of the 18<sup>th</sup> ICVG Meeting, Ankara, Turkey, 7–11 September 2015: book of abstracts. Ankara, 2015. P. 151–153. *(Здобувачем опрацьовано літературні джерела, отримано й узагальнено експериментальні дані, написано тези).*

21. Tereshchenko A., Smyntyna V., Bechelany M., **Конуп А.**, Konup I., Samukaite-Bubniene U. Optical Immunosensor Based on Nanostructured ZnO Thin Films for Agricultural Purposes. Proceedings of the 2018 IEEE 8<sup>th</sup> International Conference on Nanomaterials: Applications & Properties (NAP-2018), September 9–11, Zatoka, Odesa Region, Ukraine. 2018. *(Здобувачем проведено аналіз результатів дослідження).*

## АНОТАЦІЯ

**Конуп А. І. Діагностика вірусних хвороб винограду при створенні сертифікованого безвірусного садивного матеріалу винограду в Україні.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук зі спеціальності 06.01.11 «Фітопатологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2019.

Дисертацію присвячено удосконаленню методів діагностики вірусів для отримання безвірусного садивного матеріалу винограду в Україні, а також рекомендацій для виробництва якісних виноградних рослин (європейської біологічної категорії «сертифікований безвірусний садивний матеріал»).

Актуальність роботи була зумовлена, насамперед, необхідністю проведення діагностики вірусних хвороб винограду, що викликаються шкідливими вірусами, зокрема: вірусом скручування листя винограду різних серотипів з першого по дев'ятий (*Grapevine Leaf Roll-Associated Virus 1–9*) (*GLRaV1-9*), вірусом коротковузля винограду (*Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)*), вірусом мармуровості листя винограду (*Grapevine Fleck Virus (GFkV)*), вірусом А (*Grapevine Virus A (GVA)*) і вірусом В (*Grapevine Virus B (GVB)*) комплексу борознистості деревини винограду.

Наукова новизна одержаних результатів полягає в тому, що вперше в Україні було застосовано метод ідентифікації вірусів винограду за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією з використанням українських ізолятів. У процесі діагностики вірусних хвороб винограду та ідентифікації вірусів, збудників цих хвороб, застосовували специфічні пари праймерів і флуоресцентно мічені ДНК-зонди.

Проводили фітосанітарне обстеження на наявність зовнішніх симптомів вірусних хвороб промислових виноградників півдня України. Порівняльний аналіз діагностики методами імуноферментного аналізу, класичної полімеразної ланцюгової реакції з гель-електрофоретичним аналізом і полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією довів перевагу останньої в економічному аспекті та отриманні достовірних результатів.

**Ключові слова:** віруси винограду, імуноферментний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція, мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція, виноградник, сертифіковані саджанці винограду.

## АННОТАЦИЯ

**Конуп А. И. Диагностика вирусных болезней винограда при создании сертифицированного безвирусного посадочного материала винограда в Украине.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 06.01.11 «Фитопатология». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2019.

Диссертация посвящена актуальной проблеме в области виноградарства, а именно: усовершенствованию методов диагностики вирусных болезней винограда, а также методических рекомендаций для производства качественного посадочного материала.

Актуальность работы была обусловлена, прежде всего, необходимостью проведения диагностики вирусных болезней винограда, вызываемые вредоносными вирусами, такими как: вирус скручивания листьев винограда различных серотипов с первого по девятый (*Grapevine Leaf Roll-Associated Virus 1–9*) (*GLRaV1-9*), вирус короткоузлия винограда (*Grapevine Fanleaf Virus*) (*GFLV*), вирус мраморности листьев винограда (*Grapevine Fleck Virus*) (*GFkV*), вирус А (*Grapevine Virus A*) (*GVA*) и вирус В (*Grapevine Virus B*) (*GVB*) комплекса борозчатости древесины винограда.

Проводили фитосанитарное обследование на наличие внешних симптомов вирусных болезней промышленных виноградников юга Украины. Методом иммуноферментного анализа подтверждено, что накопление вируса в виноградном растении колеблется на протяжении всего вегетационного периода от максимального до минимального в различных участках растения, и лучшим материалом для идентификации являются соскобы кортикального слоя черенков лозы винограда и листьев.

Научная новизна полученных результатов заключается в том, что впервые в Украине был применен метод идентификации вирусов винограда с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией с использованием украинских изолятов. В процессе диагностики вирусных болезней винограда и идентификации вирусов, возбудителей этих болезней, применяли специфические пары праймеров и флуоресцентно меченые ДНК-зонды. Исследовали различные объемы образца, а именно 1,0 мкл, 1,5, 2,0, 2,5 мкл, концентрацию ионов  $Mg^{2+}$ , а именно в пределах 1,0–3,0 мМ и зависимость интенсивности сигнала флуоресценции от температуры отжига праймеров для детекции вирусов.

Сравнительный анализ диагностики методами иммуноферментного анализа, классической полимеразной цепной реакции с гель-электрофоретическим анализом и полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией доказал преимущество последней в экономическом аспекте и в получении достоверных результатов.

Верифицирован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени для идентификации вирусов винограда украинских изолятов.

Впервые разработан метод диагностики вируса А винограда на основе иммобилизации антител на поверхности пленок ZnO. Благодаря такому методу была показана возможность выявления антигенов *GVA* без использования ферментов и флуоресцентных красителей. Антигены *GVA* оценивали по изменениям фотолюминесценции.

В результате проведения полимеразной цепной реакции с праймерами к различным серотипам вируса скручивания листьев выявлен девятый серотип вируса скручивания листьев винограда. Этот серотип впервые выявлен в

Украине. Установлено, что образцы винограда сорта Каберне Совиньон клонового происхождения, произрастающие в Одесской области были заражены вирусом короткоузлиа, нуклеотидная последовательность гена белка оболочки которого кластеризуется с нуклеотидными последовательностями штаммов вирусов короткоузлиа, выделенных из винограда сортов Каберне Совиньон и Цинфандель из Калифорнии, США.

**Ключевые слова:** вирусы винограда, иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, мультиплексная полимеразная цепная реакция, виноградник, сертифицированные саженцы винограда.

## ANNOTATION

**Konup A. I. Diagnosis of Viral Diseases of Grapes When Creating Certified Non-Virus Planting Material of Grapes in Ukraine.** – The Manuscript.

The dissertation for the degree of Candidate of Biological Sciences in specialty 06.01.11 «Plant Pathology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the actual problem in the field of viticulture, namely: improvement of diagnostic methods for obtaining a virulent (healthy) grapevine planting material in Ukraine, as well as recommendations for the production of quality grape plants.

The actuality of the work was conditioned, first of all, by the need for the diagnosis of virus diseases of the grapes caused by harmful viruses, such as: *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus (1–9) (GLRaV1-9)*, *Grapevine Fanleaf Virus (GFLV)*, *Grapevine Fleck Virus (GFkV)*, *Virus A (Grapevine Virus A (GVA))* and *Grapevine Virus B (GVB) Rugose wood* – associated viruses.

Phytosanitary examination for the presence of external symptoms of viral diseases was carried out at industrial vineyards of South of Ukraine.

The scientific novelty of the obtained results is that for the first time in Ukraine, the method of identification of grape viruses using polymerase chain reaction real-time mode with hybridization-fluorescence detection using Ukrainian isolates is used.

Real time polymerase chain reaction method allows the identification of different grape viruses by means of unique pairs of primers in a short time. In the process of diagnosis, the same basis, except for specific primers and fluorescently labeled DNA probes, was used for the polymerase chain reaction products, and the composition of the polymerase chain reaction mixture.

A comparative analysis of the diagnosis by the method of immuno-enzymatic analysis and the polymerase chain reaction method in real time with hybridization-fluorescence detection proved the undoubted advantage of the latter in the economic aspect and let us get to reliable results.

**Key words:** grapes viruses, phytopathogens, polymerase chain reaction, real time polymerase chain reaction, vineyard, certified grape seedlings.

Підписано до друку 07.11.19  
Ум. друк. арк. 0,9  
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16  
Обл.-вид.арк. 0,9  
Зам. № 191013

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України  
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041  
тел.: 527-81-55







