

**Рис. 1.** Симптоми ураження вірусом червоної плямистості *Grapevine red blotch-associated* на різних сортах винограду *Vitis vinifera*. *a* – сорт Каберне Совінйон (адаксіальна поверхня листка); *б* – сорт Каберне Совінйон (абаксіальна поверхня листка); *в* – сорт Каберне Фран; *г* – сорт Піно Нуар; *д* – сорт Сіра; *е* – сорт Кариньян; *є* – сорт Мерло; *ж* – сорт Шардоне з хлоротичними ділянками; *з* – Шардоне з некротичним листом; *і* – міжвидовий гібрид Шамбурцин (Sudarshana et al, 2015)

вразливий до ураження вірусними хворобами (Golino et al, 2008; Sudarshana et al, 2015) (рис. 1).

Останнім часом вітчизняних розсадників по виробництву садивного матеріалу винограду залишилось дуже мало, і на територію України завозиться дуже багато саджанців із Центральної і Південної Європи: Австрії, Сербії, Франції, Італії, в тому числі й уражені збудниками вірусних хвороб. Віруси, що викликають ці хвороби, наносять великої шкоди виноградникам в усьому світі. Їх кількість є значною, і з кожним роком з'являються все нові форми вірусів. Вони негативно впливають на приживлюваність та

розвиток рослин винограду, якість продукції виноградарства зокрема, зниження цукристості, вихід саджанців зі шкільки, а також довговічність виноградних кущів (Cauduro Girardello et al, 2020). Виробництво садивного матеріалу із заражених вірусами чубуками прищеп і підщеп приводить до поширення хворих рослин на виноградних насадженнях, що веде до зниження ефективності експлуатації виноградників та збільшення економічних затрат. Незважаючи на те, що офіційний протокол сертифікації садивного матеріалу винограду європейських країн включає контроль на вірусну інфекцію,

насамперед, на віруси коротковузля та скручування листя винограду, ураження вірусами скручування листя (1–3-ї серотипи) є проблемою клонів французької селекції (Audeguin et al, 2012).

До шкідливих вірусів винограду, що входять до системи санітарної сертифікації садивного матеріалу, відносяться: вірус скручування листя винограду з 1-го по 9-тий 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 небезпечних 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 et al, 2013). В 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 et al, 2013; Cauduro Girardello et al, 2020). Часто вірусні хвороби протікають в латентній формі і можуть тривалий час не проявляти симптомів. Вірусні хвороби виноградних рослин системні і хронічні, тому використання хворих рослин при вегетативному розмноженні приводить до виробництва зараженого садивного матеріалу і сприяє подальшому їх розповсюдженню. Таким чином, санітарний контроль клонів сорту Каберне Совіньйон є доцільним з метою запобігання поширенню вірусів винограду та зниженню параметрів якості та приживлюваності винограду.

Метою дослідження було ідентифікувати сорт Каберне Совіньйон; встановити зараженість рослин цього високоурожайного сорту шкідливими вірусами винограду, що входять до системи сертифікації садивного матеріалу; ідентифікувати збудників вірусних хвороб за допомогою молекулярно-біологічних методів та встановити нуклеотидну послідовність гену білка оболонки 2С<sup>CP</sup> виявлених вірусів.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для досліджень були рослини винограду сорту Каберне Совіньйон клонового походження. З цією метою використовували вибірку виноградних насаджень на території Березанського району Миколаївської області (загальною площею 900 га) і Болградського, Овідіопольського і Ізмаїльського районів Одеської області (загальною площею 1260 га). Відбір, зберігання і підготовку зразків проводили згідно стандарту ISO 16578:2013. Зразки відбирали із симптомами і без них для виявлення латентної форми вірусної інфекції.

Для ідентифікації вірусів винограду використовували полімеразну ланцюгову реакцію зі зворотною транскрипцією у режимі реального часу (ЗТ-РЧ-ПЛР) з гібридаційно-флуоресцентною детекцією. Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно методики (Kumar et al, 2018; Milkus et al, 2005), листя або зішкріб здерев'янілих пагонів, у кількості 100 мг, поміщали у гомогенізатор (*Tube-mill control*, ІКА, Китай) ретельно подрібнювали, заливали 2 мл екстракційного (GGB) буферу: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – 1,59 г/л, NaHCO<sub>3</sub> – 2,93 г/л, 2 % PVP-40, 0,2 % BSA, 0,5 г/л Tween-20, 10 г/л Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (pH 9,0) і інкубували при 95 °C 10 хв в термостаті «Драй-блок» TDB-120 («Biosan», Латвія). Після цього зразки витримували в холодильнику 3 год при +4 °C.

Виділення РНК вірусів проводили згідно методики (Rowhani, 2000), а саме: 2 мкл зразка вносили в 23 мкл реакційної суміші (H<sub>2</sub>O<sub>деіон</sub> – 12,0 мкл; 10 × ПЦР-буфер – 2,5 мкл; сахароза + крезол – 2,5 мкл; 4 ммоль dNTP – 1,25 мкл (1,76 ммоль – 2,84 мкл); DTT (дітіотрейтол) – 1,24 мкл; pr1 (10 pmol) – 1,25 мкл; pr2 (10 pmol) – 1,25 мкл, Taq-полімераза (2,5 у/мкл) (*Pfu DNA*, «Fermentas», Литва) – 0,25 мкл, ревертаза (200 у/мкл) (*RevertAid<sup>TM</sup> M-MuLV*, «Fermentas», Литва) – 0,04 мкл, Mg<sup>2+</sup> (50 ммоль) – 0,75 мкл, покривали шаром олії для ПЛР і проводили ЗТ-ПЛР.

ЗТ-ПЛР у режимі реального часу з гібридаційно-флуоресцентною детекцією проводили з використанням прямого і зворотно-го праймерів, флуоресцентно мічених ДНК-зондів, реакційної суміші, в кількості 20 мкл (H<sub>2</sub>O<sub>деіон</sub> – 8,5 мкл; 10 × ПЦР-буфер – 2,5 мкл;



сахароза + крезол – 2,5 мкл; 4 ммоль dNTP – 2,5 мкл (1,76 ммоль – 2,84 мкл); DTT – 1,24 мкл; рг1 – 0,5 мкм; рг2 – 0,5 мкм; флуоресцентний зонд – 0,1 мкм, Taq-полімераза (2,5 у/мкл) (*Pfu DNA*, «Fermentas», Литва) – 0,25 мкл; ревертаза (200 у/мкл) (*RevertAid™ M-MuLV*, «Fermentas», Литва) – 0,04 мкл; Mg<sup>2+</sup> – 3,0 ммоль і 5 мкл НКЗ, або ПКЗ, або внутрішній контроль, або досліджуваний зразок (на дно пробірки) (Osman et al, 2008). Концентрація прямого, зворотного праймерів, флуоресцентних ДНК-зондів були підібрані емпірично. Для контролю проведення реакції використовували негативний контрольний зразок (НКЗ) – 1 × ПЛР-буфер і позитивний контрольний зразок (ПКЗ) – біоматеріал із тест-системи для проведення ІФА («Agritest», Італія). Для контролю виділеної РНК використовували внутрішній контроль, синтезований для ампліфікації мРНК із мітохондрій винограду (Osman et al, 2008).

Для ідентифікації вірусів ЗТ-ПЛР в режимі реального часу використовували наступні праймери і мічені зонди (ЗАТ «Синтол», РФ) згідно (Osman et al, 2008): до вірусу скручування листя 1-го серотипу (*GLRaV1*) праймери, зонди: LR1 HSP70-149/LR1 HSP70-293r/LR1 HSP70-225p; до вірусу скручування листя 3-го серотипу (*GLRaV3*): GLRaV-3 56 f/ GLRaV-3 285 r/GLRaV-3 181p; до вірусу коротковузля винограду (*GFLV*): GFLV CP2-671f1/ GFLV CP2-671f2/GFLV CP2-822 r/GFLV CP2-761p до вірусу мармуровості винограду (*GfV*): Fleck 239 f/Fleck 328 r/Fleck 261 p1; до вірусу А комплексу борознистості деревини винограду (*GVA*): GVA-77 f/GVA-192 r1/ GVA-192 r2/ GVA-104 p; до вірусу Б комплексу борознистості деревини винограду (*GVB*): GVB-92 f1/GVB-202 r1/GVB-119 p1.

Зворотна транскрипція і ампліфікація включала наступні цикли: при 50 °С впродовж 2 хв, 95 °С впродовж 15 хв і 45 циклів 95 °С впродовж 15 с і 57 °С – 1 хв. Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері *Rotor-Gene 6000* («Corbett Research», Австралія). Накопичення флуоресцентного сигналу вимірювали по 5-ти каналам відповідно: FAM/Green (470/510 нм), JOE/Yellow/HEX (530/555 нм), ROX/Orange (585/610 нм), Cy5/Red (625/660 нм) – для ідентифікації вірусів і Cy3.5/Orange (585/

610 нм) – для сигналу ендogenous внутрішнього контролю. Продукти ампліфікації детектували за рахунок збільшення флуоресценції інтеркалюючого барвника при утворенні комплексу з дволанцюговою ДНК для ідентифікації одного вірусу і 5-ти інтеркалюючих барвників для мультиплексної ПЛР (FAM™ чи SYBR Green I, JOE™, ROX™, Cy5™, Cy3.5™). Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів проводили за допомогою програмного забезпечення програми *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7*. Позитивним вважався зразок, при аналізі якого спостерігається зростання флуоресцентного сигналу на одному з колірних каналів ампліфікатора.

Синтез праймерів було здійснено компанією «Fermentas», Литва. Синтез кДНК з РНК рослинного матеріалу проводили в ході зворотної транскрипції з використанням набору «Реверта-Л» («Fermentas», Литва).

Продукти ПЛР очищували за допомогою колонок GeneJET PCR Purification («Thermo Scientific», США). Секвенування ампліфікованих ділянок кДНК вірусу *GFLV* проводили за допомогою тест-набору для секвенування DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) v. 3.1. Електрофорез зразків проводили за допомогою ДНК-аналізатора ABI PRISM 3500. Аналіз нуклеотидних послідовностей виконували за допомогою програми Sequencing Analysis (версія 5.4).

([http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_064539.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_064539.pdf); [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4346366\\_DNA\\_Sequenc\\_Analysis\\_5\\_1\\_UG.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4346366_DNA_Sequenc_Analysis_5_1_UG.pdf)).

Для аналізу еволюційного зв'язку одержаний сіквенс гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> (номер GenBank MN072356.1) порівнювали з базою даних NCBI GenBank. Для пошуку подібних послідовностей було використано порівняння нуклеотидної послідовності довжиною 227 п.н., визначеної в цьому дослідженні, та фрагментів такої ж довжини, визначених алгоритмом NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Відстань оцінювали за допомогою методу максимальної подібності за моделлю заміни (General Time Reversible, GTR). Вирівнювання послідовностей і побудова дендрограм здійснювалися програмою «Mega X» (Kumar et al, 2018).

Для мікросателітного аналізу (SSR-аналіз) ДНК винограду виділяли із заморожених при  $-20^{\circ}\text{C}$  молодих листків згідно методики (Sivolap et al, 1992). Для підтвердження сорту клонового матеріалу Каберне Совіньйон були використані пари мікросателітних маркерів серій VVS – VVS2 (Martinez et al, 2005).

Реакційна суміш для ПЛР (об'єм 25 мкл) містила: 20 ng геномної ДНК, 200 мкм кожного dNTP, 1 – 2,5 ммоль  $\text{MgCl}_2$  (залежно від типу праймерів), 0,01 % твін-20, 1 U. Taq-полімерази, 0,2 мкм кожного праймеру. Ампліфікацію проводили на термоциклері Терцик (ДНК-технологія, Росія), у режимі: початковий цикл – 4 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50-58^{\circ}\text{C}$ , 1,5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ ; основний етап 35 циклів – 1 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50-58^{\circ}\text{C}$  (залежно від типу праймерів), 1,5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ ; фінальний етап 1 цикл – 1 хв при  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 с при  $50-58^{\circ}\text{C}$ , 5 хв при  $72^{\circ}\text{C}$ .

Фрагменти ампліфікації візуалізували за допомогою електрофорезу у 8%-вому поліакриламідному гелі (ПААГ) у буфері  $1 \times \text{TBE}$ . Для фіксації продуктів ампліфікації використовували забарвлення нітратом срібла. Отримані дані документували за допомогою відеосистеми UVP Bioimaging Systems EC3. Розмір поліморфних фрагментів ДНК визначали за допомогою комп'ютерної програми «Launch Vision WorksLS» згідно стандарту – *pBR 322 DNABsu R1 (Hae III)* («Fermentas», Литва).

**Результати.** У результаті обстеження виноградників були виявлені кущі винограду з симптомами вірусної хвороби коротковузля (3 рослини), при цьому на рослинах спостерігали характерну деформацію листя, укорочення міжвузля, відставання кущів в рості, зниження врожаю, горошіння ягід на гроні (рис. 2). Але всі ці симптоми не є показниками коротковузля і можуть бути як проявом інших хвороб, таких як еutipоз, так і результатом дії гербіцидів.

На виноградниках в Одеській області на сорті Каберне Совіньйон було виявлено виноградні кущі з симптомами скручування листя (рис. 3) (5 рослин). При цьому відмічали скручування листя, які приймали форму трикутника і змінювало колір від зеленого до червоного (рис. 3).

Кущів винограду сорту Каберне Совіньйон на виноградниках Миколаївської і Одеської об-



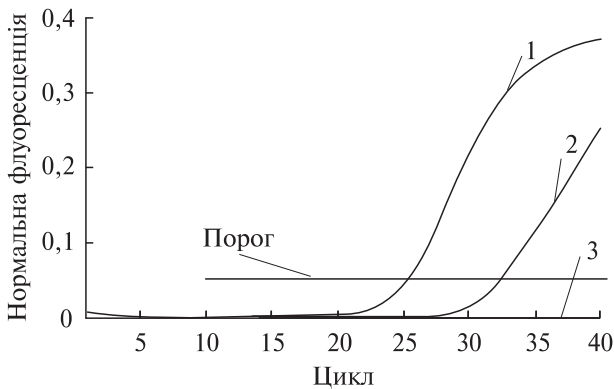
Рис. 2. Симптоми коротковузля винограду, сорт Каберне Совіньйон (Миколаївська обл., 2019)



Рис. 3. Кущ винограду сорту Каберне Совіньйон з симптомами вірусної хвороби скручування листя винограду (Одеська обл., 2019 р.)

ластей з симптомами мармуровості і комплексу борознистості деревини не було виявлено.

В результаті проведення ЗТ-РЧ-ПЛР у відібраних зразків на наявність всіх вірусів винограду було ідентифіковано ураження кущів винограду сорту Каберне Совіньйон клоново-



**Рис. 4.** Детекція вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу. 1 – вірус коротковузля в рослинах сорту Каберне Совіньйон, клон 15; 2 – ПКЗ, 3 – НКЗ

го походження вірусом коротковузля винограду (рис. 4). В цих зразках вірусу скручування листя не було виявлено.

У процесі постановки цього експерименту було підібрано умови проведення ЗТ-ПЛР у реальному часі з використанням відповідних праймерів і флуоресцентних зондів. Для контролю ЗТ-РЧ-ПЛР було використано НКЗ (негативний контрольний зразок) – реакційна суміш без ДНК і контроль виділення РНК, праймери і флуоресцентні зонди. Досліджували інтенсивність флуоресцентного сигналу від різних концентрацій  $MgCl_2$  (рис. 4). Для вибору оптимальної концентрації іонів  $Mg^{2+}$  при проведенні ЗТ-РЧ-ПЛР готували реакційні суміші з послідовними розведеннями розчину в діапазоні 1,0–3,0 ммоль. Було встановлено, що крива флуоресцентного сигналу була більш оптимальною при концентрації  $MgCl_2$  в діапазоні 3,0–2,5 ммоль. Показники прямого, зворотного праймерів і флуоресцентних ДНК-зондів було підібрано емпірично. Концентрація

прямого і зворотного праймерів була не більше 0,5 ммоль, концентрація флуоресцентного ДНК-зонду – 0,1 ммоль. Досліджували різні об'єми зразку, а саме 1,0; 1,5; 2; 2,5 мкл і різні об'єми реакційної суміші. Встановлено, що найбільш оптимальним виявився об'єм зразка 2 мкл, об'єм реакційної суміші – 18 мкл. В експерименті випробували різні показники температури відпалу, температура 54 °С виявилась більш оптимальною.

Вірус скручування листя винограду 1-го та 3-го серотипів, вірус А, Б комплексу борознистості деревини і вірус мармуровості у рослинах даного сорту виявлено не було.

За допомогою SSR-аналізу було встановлено, що зразок рослини винограду, який виявився ураженим вірусом коротковузля, має всі властивості саме сорту Каберне Совіньйон (таблиця).

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. 5) (Oliver et al, 2010).

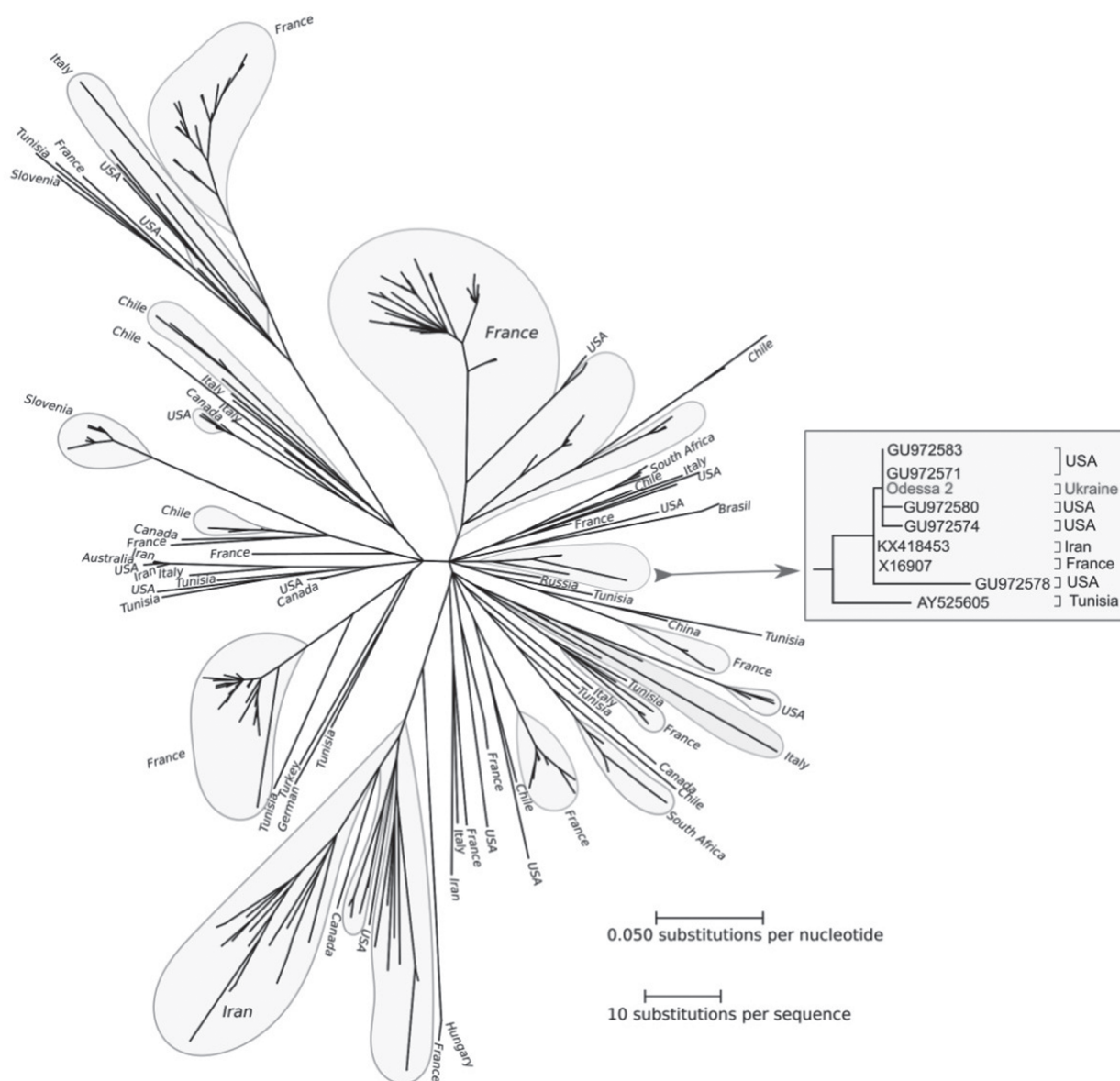
Усі ідентифіковані високогомологічні нуклеотидні послідовності були фрагментами геному вірусу коротковузля GFLV (фрагменти наступних послідовностей були проаналізовані, згруповані за сайтом вибірки): (All highly homologous nucleotide sequences identified were the fragments of the GFLV genome (fragments of the following sequences were analyzed, grouped by sampling site): Australia: U11768; Brazil: AF418579, EU038294, EU258680, EU258681; Canada:

**Характеристика мікросателітних локусів зразка сорту Каберне Совіньйон, ураженого вірусом коротковузля винограду**

Мікросателітні локуси і характеристика генотипів (п.н)

VVS2	VVMD7	VVMD27	VRZAG62	VRZAG79	VVMD28	VVMD32
140	245	179	195	258	249	259
154	246	189	199	259	248	255

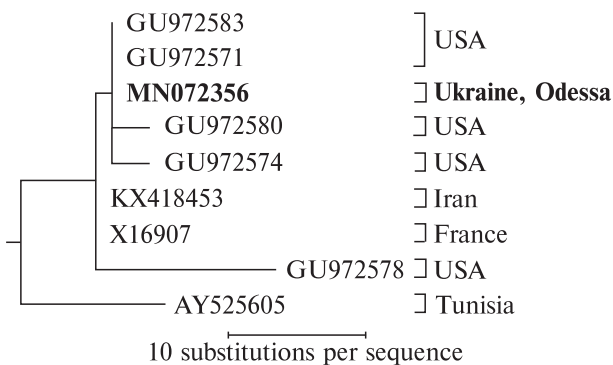




1 ttgatgctta taaccggata actagtagaa ttactgctag tgcggatccc gtatacacct  
 61 tgtcagtccc acattggctt atccaccata agttgggcac gttttcatgt gagatagact  
 121 atggagaatt gtgtgggtcat gctatgtggt ttaaatacaac cacatttgaa tctccaaggt  
 181 tgcatttcac gtgtttaacg ggcaacaaca aagagttagc ggcagactgg caagctgtcg  
 241 tagaactata tgccgaattg gaagaggcca cttcttt

**Рис. 5.** Оцінка генетичних відстаней за допомогою моделі заміни GTR з частотою гамма-розподілу заміни ( $\alpha = 0,6785$ ) та припущенням еволюційно незмінних ділянок (25,79 % ділянок). Номер GenBank MN072356.1. (The estimation of genetic distances by means the GTR substitution model with the gamma distribution frequency of substitutions ( $\alpha = 0,6785$ ) and the assumption of evolutionary unchanged sites (25,79 % of sites). GenBank Number MN072356.1.)

JX513890, JX559643, MH802026, MH802029, KC256956 – KC256966; China: AJ318415, MH802031; Chile: DQ526452, KC256954, HM068508; France: AY370942 – AY371016,



**Рис. 6.** Дендрограма, що показує взаємозв'язки між ізолятом вірусу *Grapevine fanleaf*, виявленим на сорті Каберне Совіньйон в Одеській області, та найбільш подібними послідовностями з бази даних NCBI GenBank. Дендрограму послідовностей фрагментів гена білка оболонки вірусу 2С<sup>CP</sup> довжиною 282 п.н. генерували за допомогою пакета MEGA X

AY371018 – AY371025, AY371027, AY780899 – AY780903, EF426823 – EF426851, FJ544931 – FJ544939, KX034906 – KX034949, MF18232355, MH38790 Germany: AY017338; Hungary: AY371026, EF426852; Iran: AY997693, AY997697 – AY997699, FJ513376 – FJ513386, JQ071374, JQ071375 – JQ071377, KJ913789 – KJ913794, KJ913797, KJ913799 – KJ913801, KJ913807, KJ913810, KX418443 – KX418446, KX418448 – KX418450, KX418453, KX418454, KX418456; Italy: DQ362920 – DQ362932, DQ362934, HG939477, HG939478, HG939480; Russia: HG939482; Slovenia: DQ922652 – DQ922665, DQ922671, DQ922672, DQ922674 – DQ922677, DQ922679; South Africa: EU702440 – EU702446, EU702448, EU702449, EU702451, JF968121, KC900163; Tunisia: AY525605, AY525606, MH545676 – MH545683; Turkey: HG939483; United Kingdom: MF576058; USA: AF304013 – AF304015, EU573307, GQ332364 – GQ332371, GU972571, GU972573 – GU972581, GU972583, GU972584, HG939481, JX513895, KC162001, KC427992, X60775).

У ході наступного аналізу еволюційних відношень виявленого вірусу коротковузля по фрагменту нуклеотидної послідовності гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> проведена оцінка генетичних відстаней з використанням моделі замінів *GTR* з гама-розподілом частоти замінів ( $\alpha = 0,6785$ ) і допущенням наявності еволюційних незмінних сайтів (25,79 % сайтів). На рис. 6 показана

дендрограма нуклеотидних послідовностей фрагмента гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> *GFLV*, виявленого у зразку сорту Каберне Совіньйон в Одеській області і нуклеотидних послідовностей фрагментів того ж гена ізолятів вірусу коротковузля з різних регіонів світу, які представлені в базі *NCBI GenBank*, яка була побудована з використанням алгоритмів пошуку максимальної правдоподібності топології.

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 гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> вірусу *GFLV* кластеризується з нуклеотидними послідовностями вірусів коротковузля, виділених із рослин винограду сортів Каберне Совіньйон і Зінфандель із Каліфорнії, США (GU972583, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571, GU972571). Незначні відмінності з ідентифікованою нуклеотидною послідовністю демонстрували також зразки з Ірану (KX418453) і Франції (X16907). Слід зазначити, що нуклеотидна послідовність вірусу коротковузля із Франції (X16907) була анована в базі *NCBI GenBank* ще в 1989 р.

Визначена нами нуклеотидна послідовність була ідентичною послідовності сегмента гена поліпротеїну RNA2 від 2027 до 2303 нуклеотидів ізолята вірусу коротковузля CAZINA1, (доступ: GU972571.1 GI: 299118250).

**Обговорення.** В результаті проведення фітосанітарного обстеження в Миколаївській і Одеській областях було виявлено кущі винограду сорту Каберне Совіньйон клонового походження з симптомами ураження вірусом коротковузля, що було підтверджено молекулярно-біологічними методами досліджень. З 2000 досліджених кущів було виявлено і ідентифіковано *GFLV* у 3-х уражених рослинах винограду.

Симптоми вірусу В комплексу борознистості деревини не було виявлено на клоновому матеріалі сорту Каберне Совіньйон. Треба визнати, що санітарний стан сорту Каберне Совіньйон клонового походження є задовільним і відповідає вимогам до сертифікованого



садивного матеріалу. В результаті вегетативного розмноження винограду відбувається накопичення соматичних мутацій, які є джерелом клональної мінливості (Vondras et al, 2019; Osman et al, 2008), тому в деяких випадках для уточнення їх походження використовували мікросателітний аналіз. В результаті проведення нами мікросателітного аналізу встановлено, що досліджуваний клоновий матеріал відповідає оригінальному сорту Каберне Совіньйон.

Санітарно-генетичний статус сорту Каберне Совіньйон клонального походження в цілому відповідає вимогам до уражень ( $2/5 = 40\%$ ,  $4/5 = 80\%$ ) найбільш шкідливих вірусів; також результати мікросателітного аналізу підтверджують, що клони належать до сорту Каберне Совіньйон. Вивчення ізолятів *GFLV* дозволило встановити їх поширеність та наявність генетичних варіацій.

У рослинах винограду сорту Каберне Совіньйон в Одеській області ідентифікували нуклеотидну послідовність гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> вірусу коротковузля, яка кластеризується з послідовністю нуклеотидів вірусу коротковузля, виділених із рослин сортів Каберне Совіньйон і Зінфандель із Каліфорнії, США (GU972583, GU972571, GU972574, GU972580). Встановлено, що нуклеотидна послідовність гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> вірусу коротковузля, яким було уражено сорту Каберне Совіньйон, дуже близька до зразків із географічно віддалених від України районів, насамперед США (GU972583, GU972571, GU972574, GU972580), Ірану (KX418453) і Франції (X16907). Одержаний сіквенс гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> вірусу коротковузля було анотовано у GenBank за номером MN072356.1. Таким чином, проведені дослідження підтверджують санітарно-генетичний статус клону 15 сорту Каберне Совіньйон, що дозволило отримати сертифікований садивний матеріал.

Своєчасне виявлення збудників вірусних хвороб винограду і їх своєчасна ідентифікація – це найважливіша проблема для виноградарства всього світу (Mannini, Digiario, 2017; Fuchs, 2020). У цьому контексті ефективність інтегрованих стратегій запобігання поширення вірусних хвороб сильно залежить від наявності швидких, чутливих і специфічних методів діа-

гностики, в тому числі їх визначення і в латентній формі. Для того, щоб гарантувати виробництво садивного матеріалу винограду, вільного від вірусів винограду, необхідно проводити своєчасну діагностику сучасними методами (Miljanić et al, 2022). В результаті проведених нами досліджень було підтверджені результати досліджень зарубіжних колег (Osman et al, 2008; Sudarshana et al, 2015), а також була проведена робота щодо модифікації методики діагностики вірусів винограду за допомогою ЗТ-РЧ-ПЛР, яка була використана в Україні вперше, Загалом одержані данні щодо ідентифікації збудників вірусних хвороб молекулярно-біологічним методами є цінним інформаційним джерелом в аспекті запобігання поширення їх на виноградних насадженнях півдня України, що дозволить значно прискорити перевірку великої кількості досліджених зразків і запобігти їх розповсюдження.

Таким чином, навесні і восени 2019–2020 рр. було обстежено виноградні насадження в Миколаївській і Одеській областях загальною площею 900 і 1260 га відповідно. В результаті проведеного фітосанітарного обстеження виноградників було виявлено кущі винограду з симптоми вірусних хвороб, збудниками яких є віруси: скручування листя (5 рослин) і коротковузля винограду (3 рослини). За допомогою ЗТ-РЧ-ПЛР було підтверджено ураження рослин винограду вірусом коротковузля, а ураження вірусом скручування листя 1-м і 3-м серотипом не було підтверджено.

За допомогою підбраного набору мікросателітних маркерів було ідентифіковано генотип клону сорту винограду Каберне Совіньйон. Отримано алельні характеристики за SSR-локусами клону 15 сорту Каберне Совіньйон. Встановлено, що нуклеотидна послідовність гена білка оболонки 2С<sup>CP</sup> вірусу коротковузля виноградної лози українського штаму групується з нуклеотидними послідовностями штамів вірусу коротковузля лози, виділених із винограду Каберне Совіньйон та Зінфандель з Каліфорнії, США (GU972583, GU972571, GU972574, GU972580).

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин як об'єктів.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Дослідження проведено за рахунок бюджетної тематики лабораторії вірусології і мікробіології ННЦ «ІВіВ м. В.Є. Таїрова» НАН України (програма 0116U001166 «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.»).

#### DETECTION OF THE INFECTION OF THE CABERNE SAUVIGNON VARIETY OF CLONE ORIGIN BY GRAPE VIRUSES

I.A. Kovaleva, L.A. Janse, L.A. Konup, N.N. Zelenyanskaya, V.V. Vlasov, A.I. Konup, N.A. Muljukina, N. N. Kyryk, M.Y. Pikovskyi

National Scientific Center «Tairov Research Institute of Viticulture and Wine-making» NAAS of Ukraine, 27, 40 years Victory str., Odessa, 65496, Ukraine  
Institute of Plant Protection NAAS, Vasykivska Str., 33, Kyiv, 03022, Ukraine

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroyiv Oborony str., Kyiv, 03041, Ukraine

E-mail: ikovalova@ukr.net, liliya.janse@gmail.com, kmicribiol@ukr.net, ikorn1970@gmail.com, natalyanikolaevna2019@ukr.net, iviv\_nnc@ukr.net, n.konup85@ukr.net, tairmna2005@ukr.net, mprmir@ukr.net

The high-yielding Cabernet Sauvignon grape variety is susceptible to viral diseases, which may affect its productivity and taste quality. Our aim was to identify a Cabernet Sauvignon variety of clonal origin from the south of Ukraine; to detect the contamination of plants of this variety with harmful viruses included in the planting material certification system; to identify the causative agents of viral diseases using molecular methods and to establish the nucleotide sequence of the 2C<sup>CP</sup> coat protein gene of the detected viruses. Plants with the possible symptoms of *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV) and *Grapevine Leaf Roll-Associated Virus* (GLRaV) viruses were found out during the phytosanitary survey of Cabernet Sauvignon grapevine plantations. But only GFLV presence was confirmed using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and sequencing of the 2C<sup>CP</sup> coat protein gene (the GenBank accession number MN072356.1). It was established that the nucleotide sequence of the Cabernet Sauvignon plant isolate is very close to samples from regions geographically distant from Ukraine, primarily

the USA, Iran and France. Identity of the Cabernet Sauvignon variety of clone origin was also proved by the microsatellite analysis.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Almeida RPP, Daane KM, Bell VA, Blaisdell GK, Cooper ML, Herrbach E, Pietersen G (2013) Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Front Microbiol* 4:94. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094>.
- Audeguin L, Forget D, Lusseau T, Dufour M-C, Luson A (2012) GLRaV-2 Sanitation and performance of emblematic French clones of Cabernet-Sauvignon. *Proceed. the 17<sup>th</sup> Congress of the Int. Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG)* (Oct 2012, Davis, United States), University of California. Davis: 154–155. Available online: <https://icvg.org/data/ICVG-2012-Proceedings.pdf>.
- Bowers J, Meredith C (1997) The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nat Genet* 16:84–87. <https://doi.org/10.1038/ng0597-84>.
- Cauduro Girardello R, Cooper ML, Lerno LA, Breneman C, Eridon S, Sokolowsky M, Heymann H, Oberholster A (2020) Impact of grapevine red blotch disease on Cabernet Sauvignon and Merlot wine composition and sensory attributes. *Molecules* 25(14): 3299. <https://doi.org/10.3390/molecules25143299>.
- Dimovska V, Sofijanov E, Fidanka I (2013) Agrobiological characteristics of three Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.) clones, growing in R. Macedonia. *Sci Technol* 3(6):9–14. <https://eprints.ugd.edu.mk/id/eprint/6958>.
- Fuchs M (2020) Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *J Plant Pathol* 102:643–653. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00579-2>.
- Golino DA, Wolpert J, Sim ST, Benz J, Anderson M, Rowhani A (2008) Virus Effects on Vine Growth and Fruit Components of Three California ‘Heritage’ Clones of Cabernet Sauvignon. *Proc. the 2<sup>nd</sup> Annual National Viticulture Res. Conference* (July 9–11, University of California, Davis, USA) :30–31 <https://iv.ucdavis.edu/files/108857.pdf>.
- ISO 16578:2013 (2013) Molecular biomarker analysis – General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences. <https://www.iso.org/standard/57185.html>.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol* 35(6):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Mannini F, Digiaro M (2017) The Effects of Viruses

- and Viral Diseases on Grapes and Wine. In: Meng B, Martelli G, Golino D, Fuchs M (eds) *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, Cham:453–482. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7\\_23](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57706-7_23)
- Martinez LE, Cavagnaro PF, Masuelli RW, Zuniga M (2005) SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Science* 170(6):1036–1044. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.12.006>.
- Miljanić V, Jakše J, Kunej U, Rusjan D, Škvarč A, Štajner N (2022) Virome Status of Preclonal Candidates of Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) From the Slovenian Wine-Growing Region Primorska as Determined by High-Throughput Sequencing. *Front. Microbiol* 13:830866. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.830866>.
- Milkus BN, Konup LA, Zhunka ID, Limanska NB (2005) Testing of some grapevine cultivars for the presence of Crown Gall disease agent and Fanleaf and Leafroll viruses. *Mikrobiol Zhurnal* 67(1):41–48 (In Ukrainian). Available online: <http://dspace.onu.edu.ua:8080/bitstream/123456789/21393/1/41-48.pdf>.
- OIV-CST 518-2016 (2016) OIV General Principles of Sustainable Vitiviculture–Environmental–Social–Economic and Cultural Aspects. Available online: <http://www.oiv.int/en/technical-standards-and-documents/resolutions-of-the-oiv/resolution-cst>.
- Oliver JE, Vigne E, Fuchs M (2010) Genetic structure and molecular variability of *Grapevine fanleaf virus* populations. *Virus Res* 152(1–2):30–40. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.05.017>.
- Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A (2008) Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses. *J Virol Methods* 149(2):292–299. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.012>.
- Rowhani A, Biardi L, Johanson R, Saldarelli, Zhang YP, Chin J, Green M (2000) Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine viruses. *Proceed. the 13<sup>rd</sup> Int. Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)*. Adelaide, Australia: 22–23. Available online: <https://icvg.org/data/abstra.pdf>.
- Schmitt DE, Comin JJ, Sete PB, Trapp T, Ambrosini VG, Brunetto G (2020) Yield and grape must composition in ‘Cabernet Sauvignon’ grape vine subjected to potassium fertilization in high altitude soil. *Revista Brasileirade Ciencias Agrarias*. 15(4):e7482. <https://doi.org/10.5039/agraria.v15i4a7482>.
- Sivolap YuM, Verbitskaya TG, Prokopenko SN, Tulaeva MI (1992) Study of species DNA polymorphism in *Vitis vinifera* grapes. *Cytology and Genetics* 26(3):11–15
- Sudarshana MR, Perry KL, Fuchs MF (2015) Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*. 105(7):1026–1032. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI>.
- Vlasov V, Belous I, Dzhaburiya L, Bulayeva Y (2014) Development Model of Winemaking Regions in Ukraine. *Agric Sci Pract* 1(1):53–61. <https://doi.org/10.15407/agrisp1.01.053>.
- Vondras AM, Minio A, Blanco-Ulate B, Figueroa-Balderas R, Penn MA, Zhou Y, Seymour D, Ye Z, Liang D, Espinoza LK, Anderson MM, Walker MA, Gaut B, Cantu D (2019) The genomic diversification of grapevine clones. *BMC Genomics* 20:972. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6211-2>.

Надійшла в редакцію 20.06.22  
Після доопрацювання 24.06.22  
Прийнята до друку 18.11.22