

КОРОТКОВУЗЛЯ ВИНОГРАДНОЇ ЛОЗИ

на виноградниках в Одеській області, діагностика, перспективи оздоровлення методом термічної обробки

Мета. Визначити наявність вірусної хвороби коротковузля (*Grapevine fanleaf*) виноградної лози (*Vitis* spp.) на виноградниках Одеської області, ідентифікувати збудника, вивчити можливість лікування методом водної термообробки та впливу різних її температурних режимів на фізіологічні показники рослини. **Методи.** Польові — обстеження промислових насаджень на наявність симптомів коротковузля виноградної лози. Молекулярно-біологічний метод полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) у реальному часі — ідентифікація вірусу коротковузля (*grapevine fanleaf virus*). Дослідження проводили відповідно до ДСТУ 8562:2015. Ідентифікацію вірусу коротковузля винограду проводили в лабораторних умовах на обладнанні для ПЛР-лабораторії, яке проходить щорічне калібрування. **Результати.** За фітосанітарного обстеження промислових виноградних насаджень в Одеській області виявлено кущі винограду різних сортів з симптомами коротковузля. За допомогою ПЛР у режимі реального часу ідентифіковано вірус коротковузля винограду. Підібрано та рекомендовано умови проведення реакції. Вивчено вплив термотерапії як засобу оздоровлення уражених рослин вірусом коротковузля винограду. Досліджено вплив різних режимів термотерапії виноградної лози та саджанців на фізіологічні показники матеріалу *Vitis vinifera* L. при підготовці його до щеплення: калюсоутворення, проростання вічок. **Висновки.** В результаті проведеного фітосанітарного обстеження виноградників в Одеській області виявлено 20% кущів винограду із симптомами коротковузля. Удосконалено метод ЗТ-ПЛР для ідентифікації вірусу коротковузля винограду у режимі реального часу з гібридизаційно-флуоресцентною детекцією. Встановлено, що серед усіх досліджених сортів винограду найбільш сприйнятливим до вірусної інфекції виявився технічний сорт Каберне Со-

¹**Л.О. КОНУП,**
доктор сільськогосподарських наук

¹**М.І. РЯБИЙ**

¹**Н.І. НИКОЛАЄВА**

¹**А.І. КОНУП,**

кандидат біологічних наук

¹**В.Л. ЧИСТЯКОВА**

²**А.О. ВУЕК,**

кандидат біологічних наук

²**М.М. КИРИК,**

доктор біологічних наук

¹**В.В. ВЛАСОВ,**

доктор сільськогосподарських наук

¹Національний науковий центр

«Інститут виноградарства

і виноробства ім. В.Є. Таїрова»

НААН України, вул. Перемоги, 27,
сmt Таїрове, Одеський р-н, Одеська обл.,
65496, Україна

²Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ,
03041, Україна

віньйон. Доведено, що за допомогою методу термотерапії можна оздоровити виноградну лозу і саджанці, які були уражені вірусом коротковузля винограду. Підібрано оптимальний режим (50°C з експозицією 30 хв) для проведення водної термотерапії виноградної лози, який не впливає на її фізіологічні показники.

фітосанітарне обстеження; полімеразна ланцюгова реакція; вірус коротковузля винограду; grapevine fanleaf virus; термотерапія

Виноград — це цінний продукт і сировина для харчової промисловості у виробництві вин і соків [1, 2]. Проте виноград уражується шкідниками і збудниками різних хвороб. Серед дуже небезпечних хвороб виноградної

лози особливе місце займають вірусні хвороби, які широко поширені і наносять великих збитків виноградарським господарствам [3, 4]. Симптомами ураження вірусами є: пригнічений ріст рослин, зміна забарвлення листя, зниження цукру у ягодах, нехарактерна пігментація різних органів виноградної рослини і порушення метаболізму (дихання, фотосинтез), в окремих випадках загибель заражених кущів [5—8]. Найчастіше вірусні хвороби протікають у латентній формі і можуть тривалий час не проявляти симптомів, мають системний, хронічний характер. Це небезпечно за вегетативного розмноження, зумовлює виробництво зараженого садивного матеріалу і сприяє подальшому поширенню хвороби [5]. Серед таких вірусів особливе місце займає вірус коротковузля винограду (*grapevine fanleaf virus* (GFLV)) — один із найшкідливіших вірусів виноградної лози у всьому світі [9—11]. GFLV належить до роду *Nepovirus* сімейства *Comoviridae* [6]. Поширення цієї хвороби відбувається за допомогою двох видів нематод лонгидорид — *Xiphinema index* та *Xiphinema italiae*, а також вірус передається через щеплення при виробництві виноградних саджанців [12—14].

GFLV має три основних штамми, які відрізняються за симптомами, а саме: коротковузля винограду, жовта мозаїка (синонім — інфекційний хлороз) і облямування жилок винограду [15]. В Україні виявлено й докладно охарактеризовано всі три штамми коротковузля виноградної лози, а також вивчено вплив хвороби на ультраструктуру клітин листя винограду [16].

Коротковузля важко визначити візуально, адже схожі симптоми можна спостерігати на виноградних рослинах за надмірного використання гербіцидів, також при фізіологічних та агробіологічних порушеннях в рослині. Ознаки ушкодження гербіцидами зникають за 2–3 роки, а якщо рослини заражені вірусом коротковузля, то симптоми посилюються з кожним роком. Основні симптоми коротковузля виноградної лози — це, по-перше, нерівномірна довжина міжвузля (рис. 1а), пагони на таких кущах тонкі, на них можна виявити подвійні вузли (1а), а по-друге, листя у заражених рослин має характерну деформацію, жилки розходяться в'ялою, дрібні, з загостреними зубчиками і широко відкритими черешковими виїмками (рис. 1б).

Симптоми коротковузля можуть сильно відрізнятись залежно від пори року, сорту винограду та кліматичних умов. Крім того, деякі сорти можуть бути абсолютно безсимптомними, як деякі підщепи та певні білі сорти *V. Vinifera* L., що можуть служити резервуаром вірусу.

Останнім часом відбулися певні зміни в епідеміологічній ситуації на виноградниках України, що частково пов'язано із закладанням молодих виноградників імпортом садовим матеріалом. Ці зміни призвели до збільшення кількості виноградників, особливо молодих, уражених вірусними хворобами. Діагностика цих хвороб є важливою для запобігання їхньому поширенню. Крім інших збудників вірусних хвороб, таких як скручування листя винограду, мармуровість, віруси комплексу борознистості деревини, коротковузля включено до системи обов'язкового тестування виноградної лози при виготовленні сертифікованого садового матеріалу [17, 18].

Тестування рослин на наявність патогенів у рослин із симптомами хвороби і тих, що знаходяться у латентній формі, дозволяє не тільки своєчасно виявити збудників і запобігти їхньому поширенню, а й спри-



Рис. 1. Симптоми вірусу коротковузля виноградної лози, сорт Nero d'Avola: а — нерівномірна довжина міжвузля; б — в'ялоподібне листя [11]

є вивченню екології збудників, розробці профілактичних заходів, спрямованих на захист від цих хвороб винограду. Потреба оздоровлення винограду у виробництві садового матеріалу, який би не містив вірусів та інших фітопатогенів, є дуже актуальною. Тільки здоровий матеріал може слугувати базисною основою для відновлення виноградників, підвищення врожайності та економії виноградарства. Одним з таких методів є теплова терапія виноградного матеріалу.

Раніше в наукових працях авторами було показано, що термообробка може бути використана для захисту виноградних рослин від збудників фітоплазмових, бактеріальних, вірусних хвороб, хвороби Пірса і низки інших патогенів та шкідників [19–21], були підібрані оптимальні умови проведення термотерапії [21]. Результати проведених ними досліджень показали, що стійкість чубуків до термообробки різна [19]. Встановлено, що обробка чубуків винограду гарячою водою (50°C) не впливає на вічка виноградної лози [22, 23], а використання температури 55°C при-

зводить до 100% їх загибелі [23]. Підбір оптимальних режимів теплової обробки виноградної лози і саджанців винограду для отримання здорового садового матеріалу і збереження цінних сортів і клонів винограду є актуальним завданням. Це й зумовило проведення досліджень, спрямованих на розробку швидких і надійних методів діагностики коротковузля та підбору режимів термотерапії виноградної лози, ураженої вірусом даної хвороби.

Мета досліджень — виявити та ідентифікувати збудника коротковузля виноградної лози. Розробити методику оздоровлення виноградної лози від вірусу коротковузля за допомогою термотерапії.

Завдання роботи — провести обстеження виноградних насаджень на території Одеської області для визначення ураженості їх вірусом коротковузля, провести ідентифікацію збудника за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також визначити вплив різних режимів проведення термотерапії для оздоровлення виноградної лози, ураженої вірусом.

Методика досліджень. Роботу виконано впродовж 2021—2023 рр в лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут виноградарства і виноробства ім. В.Є. Таїрова» НААН України (ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова»), акредитованої відповідно до міжнародного стандарту ДСТУ EN ISO/IEC 17025:2019. Фітосанітарне обстеження виноградних насаджень проводили в дослідних господарствах ННЦ «ІВіВ ім. В.Є. Таїрова» та промислових господарствах в Одеській області згідно з ДСТУ 3355-06 «Продукція сільськогосподарська рослинна. Методи відбору проб при карантинному огляді та експертизи» та ДСТУ 4390:2005. «Технічні умови. Саджанці винограду та чубуки виноградної лози». Візуальний фітосанітарний огляд базувався на огляді кожного куща рослин у насадженнях, які обстежували. Зразки виноградних рослин відбирали за зовнішніми симптомами, що характерні проявам вірусної хвороби. Для ідентифікації вірусу відбирали зразки (листя і дерев'янілі пагони) залежно від максимального накопичення вірусних частинок у різних ділянках виноградних рослин і в різні пори року. Відбір, зберігання і підготовку зразків рослин винограду проводили згідно зі стандартом ISO 16578:2022 [24]. Для ідентифікації вірусу використовували зворотну транскриптазну полімеразну ланцюгову реакцію у реальному часі (ЗТ-ПЛР) [25].

Зразки для проведення ЗТ-ПЛР готували згідно з методикою [26, 27]. Листя та зразки дерев'янілих пагонів (100 мг) гомогенізували у приладі Tubemill control (ІКА, Китай) у 2 мл екстракційного (GGB) буфера (Na_2CO_3 — 1,59 г/л, NaHCO_3 — 2,93 г/л, 2% PVP-40, 0,2% BSA, 0,5 г/л Tween-20, 10 г/л $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, рН=9,0), інкубували при 95°C впродовж 10 хв у термостаті «Драй-блок» TDB-120 (Biosan, Латвія). Після цього зразки витримували в холодильнику 3 години при +4°C.

Для проведення ЗТ-ПЛР ви-

користували реактиви кваліфікації «для молекулярної біології», стерильні розчини та посуд. ЗТ-ПЛР проводили відповідно до атестованої методики МВВ-01-19/01-2019 з використанням реакційної суміші: 2,5 мкл РНК, 10× ПЦР-буфер, 1,5 мМ MgCl_2 , 10 мМ dNTP, 10 мкМ кожного праймера та 5 ОД/мкл Тақ-полімерази (*Pfu DNA, Fermentas*, Литва). Ревертаза (200 у/μl) (*RevertAid™ M-MuLV, Fermentas*, Литва), GFLV- специфічні праймери: GT1076 (50-ССААGG АТТGCCAGGCA-30) і GT1826 (50-ТССАТАGТGTCCC GTCC-30) [13], підібрані до ділянки геному, що знаходиться на 3'-кінці РНК2 та кодує капсидний протеїн. Праймер GT1076 є комплементарним до послідовності нуклеотидів 1064—1083, а праймер GT1826 відповідає послідовності 762—781. Синтез праймерів здійснений за нашим замовленням компанією «Fermentas», Литва. Ампліфікацію проводили в програмованому термоциклері Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd., Австралія) в режимі: початкова денатурація при 94°C протягом 4 хв; подальша денатурація при 94°C протягом 30 с (35 циклів); відпал при 57°C протягом 45 с; елонгація при 72°C протягом 60 с; фінальна елонгація при 72°C протягом 7 хв [13].

У якості негативного контрольного зразка (НКЗ) використовували ПЛР-буфер, в якості позитивного контрольного зразка (ПКЗ) — біоматеріал із тест-системи для проведення ІФА (Agritest, Італія). Для контролю виділеної РНК використовували внутрішній контроль, синтезований для ампліфікації мРНК із мітохондрій винограду. Облік результатів аналізу, розрахунок порогових циклів проводили за допомогою програми Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.

Для дослідження впливу термотерапії на вірус коротковузля і на фізіологічні параметри самої рослини використовували різні температурні режими і період витримання виноградного матеріалу в гарячій воді. В досліді використовували визрілу

виноградну лозу сортів Каберне Совіньйон, Піно чорний і Шардоне, заражену вірусом коротковузля. Обробляли виноградну лозу гарячою водою в спеціально сконструйованому приладі, що дозволяє стабільно підтримувати вказану температуру і забезпечувати тривалість обробки. В роботі застосовували такі режими: +40°C протягом 10 год; +45°C протягом 3 год; +50°C протягом 30 хв і +52°C — 7 хв. Визначали вплив різних режимів на фізіологічні показники виноградної лози.

Результати досліджень та обговорення. За обстеження виноградних насаджень було виявлено виноградні кущі сортів: Каберне Совіньйон, Шардоне, Піно чорний з симптомами коротковузля, що проявлялися в деформації листя, укороченому міжвузлі, відставанні кущів у рості, зниженню врожаю, горошінню ягід на гроні (рис. 2). Проте, такі симптоми можуть бути проявом інших хвороб, таких як еutipоз, і результатом дії гербіцидів.

Ідентифікували вірус коротковузля методом ЗТ-ПЛР. Зразки відбирали від рослин, які мали характерні симптомами ураження (рис. 1). У процесі постановки цього експерименту було підбрано оптимальні умови проведення ЗТ-ПЛР у реальному часі з використанням відповідних праймерів і флуоресцентних зондів. Удосконалення ЗТ-ПЛР-РЧ полягало в підборі умов проведення реакції, випробуванні різних концентрацій MgCl_2 , праймерів і флуоресцентних зондів, температури відпалу праймерів і часу інкубації. Досліджували інтенсивність флуоресцентного сигналу від різних концентрацій MgCl_2 . Для вибору оптимальної концентрації іонів Mg^{2+} готували реакційні суміші з послідовними розведеннями розчину в діапазоні 1,0—3,0 мМ. У результаті випробувань різних концентрацій Mg^{2+} встановлено, що лінія флуоресцентного сигналу була більш оптимальною за концентрації MgCl_2 в діапазоні 3,0—2,5 мМ. Концентрацію прямого, зворотного праймерів і флуоресцентних ДНК-зондів було підбрано емпірично і вона



Рис. 2. Кущ винограду з симптомами коротковузля виноградної лози, сорт Каберне Совіньйон (Одеська обл., 2023 р.)

становила не більше 0,5 мМ для праймерів, 0,1 мМ для флуоресцентного ДНК-зонду. Досліджували різні об'єми зразка, а саме 1,0 мкл, 1,5 2,0, 2,5 мкл та різні об'єми реакційної суміші. Встановлено, що найбільш оптимальним виявився об'єм зразка 2,5 мкл, об'єм реакційної суміші — 20 мкл. У процесі підбору найкращого режиму ампліфікації з даною парою праймерів температуру відпалу було змінено. За випробувань різних температур відпалу в реакції, (40°C, 45, 48, 50 та 54°C), встановили, що оптимальною температурою є 54°C, при цьому інтенсивність флуоресцентного сигналу детекції вірусу була найбільшою (рис. 3) та спостерігалася менша кількість неспецифічних продуктів реакції, ніж за інших температур.

Проблема захисту рослин від вірусних хвороб, а також підтримки і зберігання колекційного генофонду вирішується за допомогою різних методів, у тому числі і методом термотерапії [21]. Виноградари в усьому світі для профілактики і в якості карантинних заходів у розмноженні винограду часто використовують два види обробки гарячою водою: 1 — короткий, обробка гарячою водою при 52°C протягом 5 хв для знищення зовнішніх шкідників, таких як *Viteus vitifoliae*; 2 — тривалий, обробка гарячою водою при 50°C протягом 45 хв, згідно з методикою для контролю як зовнішніх, так і ендогенних шкідників та фітопатогенів [28]. Такий режим рекомендовано і в стандарті ЕРРО РМ 4/8 для захисту від вірусу

коротковузля [29]. Для лікування виноградної лози, ураженої фітоплазмовими хворобами, обробка гарячою водою була запропонована ще у 1966 р. Caudwell [19, 29]. Термотерапія є значним стресом для виноградної лози і це може призвести до її втрати за неправильного застосування. Рослинний матеріал, що підлягає термотерапії, має бути повністю здерев'янілим і завершити свій вегетативний цикл [30, 31]. До обладнання для проведення термообробки виноградної лози є певні вимоги, а саме: резервуари для гарячої води, в яких проводять термообробку, виготовлені з інертного матеріалу; мають бути засоби циркуляції та підігріву води для того, щоб підтримувати постійну рівномірну температуру; потрібна відповідна термоізоляція для обмеження втрат тепла; вимірювальне обладнання у вигляді датчиків контролю, з них один розташований на глибині 100 мм від низу резервуара, інший — на 100 мм від поверхні.

Моделювання промислових умов обробки проводили спочатку на лабораторному обладнанні. У стерилізаторі для дослідження оптимальних умов термотерапії застосовували такі режими: +30°C — 10 год; +40°C — 5 год; +50°C — 30 хв; +52°C — 7 хв. Визначали вплив різних режимів на фізіологічні показники виноградної рослини — калюсоутворення та проростання вічок (табл.). Відомо, що найбільш сприйнятливим до термообробки є сорт Піно чорний. Сорти Шардоне і Каберне Совіньйон були стійкими до цього процесу [32]. У досліді використовували по 10 виноградної рослини цих сортів. Використовували чубуки виноградної лози, заражені вірусом коротковузля. Після проведення термообробки чубуків визначали наявність вірусу методом ЗТ-ПЛР.

Згідно з отриманими результатами (табл.) температурні режими в різній експозиції не впливали на утворення калюсу і розпускання вічок на чубуках рослин, крім режиму +52°C — 7 хв. Затримка в розпусканні

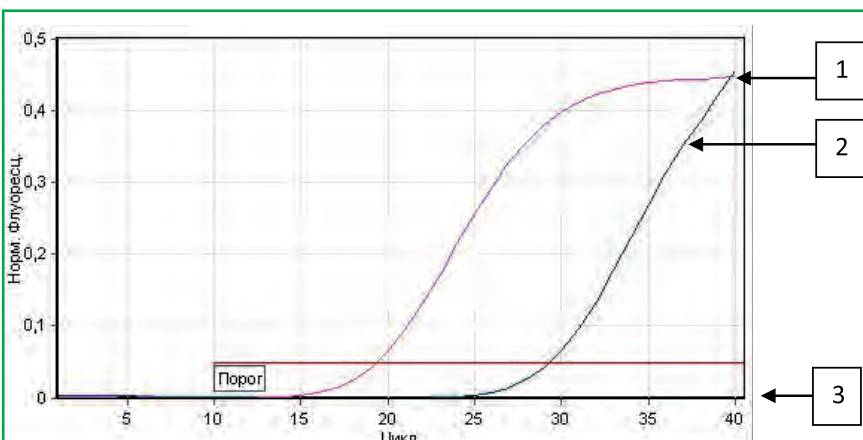


Рис. 3. Детекція вірусу коротковузля винограду методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу: 1 — вірус коротковузля в рослинах сорту Каберне Совіньйон; 2 — ПКЗ; 3 — НКЗ

Результати впливу температури і часу експозиції на фізіологічні показники чубуків виноградної лози

Сорт, кількість рослин	Умови досліджень	Утворення калюсної тканини, +/-	Кількість (шт.) пророслих вічок через ... діб		
			15	17	25
Каберне Совінйон, 10	30°C — 10 год	+	10 ± 1	10 ± 2	10 ± 2
	40°C — 5 год	+	6 ± 2	9 ± 1	10 ± 2
	50°C — 30 хв	+	3 ± 0	6 ± 1	10 ± 2
	52°C — 7 хв	-	-	-	4
	Контроль	+	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
Шардоне, 10	30°C — 10 год	+	7 ± 1	9 ± 2	10 ± 2
	40°C — 5 год	+	5 ± 1	7 ± 2	10 ± 1
	50°C — 30 хв	+	2 ± 1	4 ± 1	10 ± 2
	52°C — 7 хв	-	-	-	2
	Контроль	+	10 ± 2	10 ± 2	10 ± 2
Піно чорний, 10	30°C — 10 год	+	8 ± 1	9 ± 2	10 ± 3
	40°C — 5 год	+	4 ± 1	7 ± 2	10 ± 2
	50°C — 30 хв	+	2 ± 0	3 ± 2	10 ± 2
	52°C — 7 хв	-	-	-	1 ± 1
	Контроль	+	10 ± 2	10 ± 2	10 ± 2

вічок на чубуках відбувалась у варіантах температура +40°C протягом 5 год і +50°C протягом 30 хв, але на 25-ту добу всі вічка розпускались. При режимі +52°C — 7 хв утворення калюсу не відбувалося і тільки у кількох рослин з 10-ти на 25-ту добу спостерігали розпускання вічок. Є думка, що в процесі обробки лози гарячою водою створювалися екстремальні умови для лози і одразу після термотерапії починалося ферментативне дихання, яке тривало 24 год, а можливо і довше. Це пов'язано з наповненням тканин чубуків водою з невисоким вмістом кисню, що може бути причиною затримки розпускання вічок. Після визначення оптимальних режимів термообробки в лабораторних умовах ці режими використовували на промисловій установці.

Аналізуючи температурні режими, які були досліджені на лабораторному обладнанні, для масової теплової обробки на промисловому обладнанні оптимальним рекомендовано режим 50°C протягом 30 хв. Лозу після термотерапії і перевірки на відсутність вірусу коротковузля використовували для виробництва сертифікованих саджанців.

ВИСНОВКИ

За фітосанітарного обстеження виноградників Одеської області було виявлено кущі виноградних рослин сортів Каберне Совінйон, Піно чорний і Шардоне з симптомами коротковузля виноградної лози. Встановлено, що сорт Каберне Совінйон був найбільш ураженим *grapevine fanleaf virus*. Ідентифікацію проводили молекулярно-біологічним методом (ЗТ-ПЛР) у режимі реального часу з флуоресцентною детекцією. Удосконалено систему ідентифікації вірусу коротковузля виноградної лози методом ЗТ-ПЛР у режимі реального часу за рахунок оптимізації умов проведення ЗТ-ПЛР. Досліджено вплив різних режимів температурної обробки виноградної лози як метод оздоровлення виноградної лози від вірусу коротковузля, а також на фізіологічні показники — калюсоутворення та проростання вічок. Встановлено, що найбільш оптимальним лікувальним ефектом був режим обробки гарячою водою за температури 50°C протягом 30 хв.

Фінансування: дослідження проведено за рахунок бюджетної тематики лабораторії вірусології і мікробіології Національного наукового центру «Інститут ви-

ноградства і виноробства імені В.Є. Таїрова» НААН України (програма ДРН№0121U107838 «Дослідження масштабів ураженості виноградних насаджень Півдня України вірусними, фітоплазмовими і бактеріальними хворобами винограду, діагностика та створення системи оздоровлення від них при виробництві сертифікованого посадкового матеріалу»).

Конфлікт інтересів: проведені дослідження, викладені у статті, не мають конфліктів будь-якого роду, що стосуються комерційних, фінансових, авторських відносин, відносин з організаціями або особами, які будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, і взаємин співавторів статті.

ЛІТЕРАТУРА

- Myles S., Boyko A.R., Brown P.J. et al. Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. 108. P. 3530-3535.
- Мілкус Б.Н., Лиманська Н.В., Жунько І.Д., Конуп Л.О. Вірусні, бактеріальні і фітоплазмові хвороби винограду: монографія. Одеса. 2012. 296 с.
- Kovaleva I.A., Janse L.A., Konup L.A. et al. Detecting the Infection of the Cabernet Sauvignon Variety of Clonal Origin by Grape Viruses. *Cytology and Genetics*. 2022. Vol. 56. No. 6. P. 31-41. <https://www.doi.org/10.3103/S0095452722060044>
- Martelli G.P., Uyemoto J.K. *Plant Virus Diseases: Fruit Trees and Grapevine*. Encyclopedia of Virology (Third Edition). 2008. Pages 201-207. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00727-5>
- Martelli G.P. *Grapevine Virology Highlights: 2010-2012*. Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, California, USA October 7-14. 2012. P. 13-31.
- Mayo M.A., Robinson D.J. *Nepoviruses: Molecular biology and replication*. In: *The Plant Viruses. Polyhedral virions and bipartite RNA genomes*. Plenum Press, New York. 1996. P. 139-185.
- Martelli G.P. *Where Grapevine Virology is Heading To*. Proceedings of the 19th Congress of ICVG, Santiago, Chile. 2018. P. 10-15.
- Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. Control of Viruses Infecting Grapevine. *Advances in Virus Research*, 2015. 91. P. 175-227. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.11.002>
- Panno S., Caruso A.G., Bertacca S. et al. Genetic Structure and Molecular Variability of Grapevine Fanleaf Virus in Sicily. *Agriculture*. 2021. 11(6). P. 496. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060496>
- Asma Toumi, Amira Mougou-Hamdane, BesmaMrabet Saamali et al. Analysis of the grapevine fanleaf disease and genetic diversity of tunisian GFLV isolates. *Journal of Research in Biological Sciences*. 2018. 03. P. 57-62. 56 p- ISSN: 2356-573X / e-ISSN: 2356-5748
- Stefano Panno, Andrea Giovanni Caruso,

Sofia Bertacca et al. Genetic Structure and Molecular Variability of Grapevine Fanleaf Virus in Sicily. *Agriculture*. 2021. 11(6). P. 496. <https://doi.org/10.3390/agriculture11060496>

12. Nguyen V.C., Khallouk S., Polidori J. et al. Evidence of sexual reproduction events in the dagger nematode *Xiphinema* index in grapevine resistance experiments under controlled conditions. *Plant Disease*. 2021. 105. P. 2664-2669. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1409-RE>

13. Mrabet Samaali B., Loulou A., Mougou Hamdane A., Kallel S. Acquisition and transmission of Grapevine fanleaf virus (GFLV) by *Xiphinema* index and *Xiphinema italiae* (Longidoridae). *Journal of Helminthology*. 2024. 98. e26. P. 1-9. <https://doi.org/10.1017/S0022149X24000154>

14. Mohamed Youssef Banora, Roger Voisin, Van Chung Nguyen et al. *Xiphinema* index-resistant grapevine materials derived from muscadine are also resistant to a population of *X. diversicaudatum*. *OENO One*. 2022. Vol. 56 No. 4. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.4.5489>

15. Elbeaino T., Kiyi H., Boutarfa R. Phylogenetic analysis of the homing protein domain of Grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with “yellow mosaic” and “infectious malformation” syndromes in grapevines. *Archives of Virology*. 2014. 159. P. 2757-2764. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2138-8>

16. Жунько І.Д., Ліманська Н.В., Мілкус Б.Н., Іваниця В.О. Віруси та вірусні хвороби винограду (*Vitis* sp.). *Мікробіологія і біотехнологія*. 2015. № 3. С. 6-17. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.3\(31\).53575](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2015.3(31).53575)

17. Commission Implementing Directive (EU) 2020/177 of 11 February 2020 amending Council Directives 66/401/EEC, 66/402/EEC, 68/193/EEC, 2002/55/EC, 2002/56/EC and 2002/57/EC, Commission Directives 93/49/EEC and 93/61/EEC and Implementing Directives 2014/21/EU and 2014/98/EU as regards pests of plants on seeds and other plant reproductive material.

18. Commission Directive 2005/43/EC of 23 June 2005 amending the Annexes to Council Directive 68/193/EEC on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine.

19. Caudwell J., Larrue C., Valat and S. Grenan. Hot water treatments against flavescence doree of grapevine on dormant wood. 10th ICVG Conference, Volos, Greece, 3-7th September 1990. P. 336-343.

20. Bertaccini A., Borgo M., Bertotto L. et al. Termoterapia e chemioterapia per eliminare i fitoplasmi da materiali di moltiplicazione della vite. *L'Informatore Agrario*. 2001. 57(42). P. 137-144.

21. Boudon-Padieu E., Grenan S. Hot water treatment. 2002. URL: <http://www.icvg.ch/data/icvghotw.pdf>

22. Wample R.L., Bary A, Burr T.J. Heat tolerance of dormant *Vitis vinifera* cuttings. *Am. J. Enol. Vitic.* 1991. 42(1). P. 67-72. <https://doi.org/10.5344/ajev>

23. Helen Waite, P. May. The Effects of Hot Water Treatment, Hydration and Order of Nursery Operations on Cuttings of *Vitis vinifera* Cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*. 2005. 44(2). P. 144-152. <https://doi.org/10.14601/Phytopathol>

24. ISO 16578:2022(en) Molecular biomarker analysis — Requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences.

25. Osman F, Hodzic E, Kwon S.J. et al. Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of *Citrus tristeza virus*,

Citrus psorosis virus, and *Citrus leaf blotch virus*. *Journal of Virological Methods*. 2015. 220. P. 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.013>

26. Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018. 35. P. 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

27. Мілкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько І.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковозуля та скручування листя. *Мікробіологічний журнал*, 2005. Т. 67. №1. С. 41-48.

28. Hot water treatment of grapevine to control Grapevine flavescence doree phytoplasma. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2012. 42 (3). P. 490-492. URL: <https://10.1111/epp.2594>

29. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. European and Mediterranean Plant Protection Organization Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes PM 4/8 (2) 2008 OEPP/EPPO, *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 38. P. 422-429.

30. Caudwell A., Larrue J., Volot C., Grenan S. Hot-water treatment against flavescence doree on dormant wood. In *Proceedings of the 10th Meeting of ICVG*. 1991. Volos (GR).

31. Waite H. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. *Phytopathologia Mediterranea*. 2007. 46. P. 5-17. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1857

32. Caudwell A., Larrue J., Boudon-Padieu E., McLean G.D. Flavescence doree elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 1997. 3. P. 21-25. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00112.x>

¹Konup L.,
ORCID: 0000-0002-1102-1697

¹Riabyi M.,
ORCID: 0009-0003-6608-135X

¹Nikolaeva N.,
ORCID: 0000-0003-1278-2188

¹Konup A.,
ORCID: 0000-0002-8717-3136

¹Chystiakova V.,
ORCID: 0000-0003-1278-2188

²Vuek A.,
ORCID: 0000-0002-9148-0841

²Kyryk M.,
ORCID: 0000-0001-5257-7432

¹Vlasov V.,
ORCID: 0000-0002-7390-7047

¹National Scientific Centre «Institute of viticulture and winemaking named after V.E. Tairov» of the NAAS, 27, Peremohy str., Tairove settlement, Odesa district, Odesa region, 65496, Ukraine

²National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, 15, Heroiv Oborony str., 03041, Kyiv, Ukraine

Grapevine fanleaf degeneration disease (GFDD) in vineyards in the Odesa region, diagnosis, prospects for its recovery by heat treatment

Goal. Grapevine fanleaf virus (GFLV) is one of the main causes of

grapevine fanleaf degeneration disease (GFDD) and is present in almost all areas where grapevine (*Vitis* spp.) is cultivated. In this work, we ascertained the presence and spread of GFLV in different commercial vineyards in Odesa region, to identify the causative agent, to study the possibility of its treatment by the method of water heat treatment and the influence of its different temperature regimes on the physiological parameters of the plant. **Methods.** Field — examination of industrial plantations for the presence of symptoms of grapevine short knot. Molecular biological method of polymerase chain reaction (PCR) in real time — identification of grapevine fanleaf virus. Research was conducted in accordance with DSTU 8562:2015. The identification of grape short knot virus was carried out in laboratory conditions on the equipment for the PCR laboratory, which undergoes annual calibration.

Results. As a result of the phytosanitary survey of industrial grape plantations in the Odesa region, grape bushes of various varieties with symptoms of short knot were found. With the help of real-time PCR, grape short knot virus was identified. The reaction conditions are selected and recommended. The effect of thermotherapy as a means of improving the health of plants affected by grapevine shortknot virus was studied. The influence of different modes of heat therapy of grape vines and seedlings on the physiological indicators of *Vitis vinifera* L. material during its preparation for grafting: callus formation, cell germination was studied. **Conclusions.** As a result of the conducted phytosanitary survey of vineyards in the Odesa region, grape bushes with symptoms of short knot were found, which amounted to 20%. The PCR method for the identification of grape short knot virus in real time with hybridization-fluorescence detection has been improved. It was established that among all the grape varieties studied, the technical variety Cabernet Sauvignon was the most susceptible to viral infection. It has been proven that with the help of the method of thermotherapy, it is possible to heal grape vines and seedlings that have been affected by the short knot virus of grapes. The optimal mode (50°C with exposure of 30 min.) was selected for water thermotherapy of grape vines, which did not affect their physiological parameters.

phytosanitary inspection; polymerase chain reaction; grape short knot virus; grapevine fanleaf virus; thermotherapy

Надійшла до редакції: 18.10.2024
Прийнята до друку: 18.11.2024
Надруковано й опубліковано онлайн:
березень 2025