

УДК 578.42:578.53:578.427

**ПРОБЛЕМАТИКА И РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ
ВИРУСА СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА****PROBLEMS AND PREVALENCE
OF GRAPEVINE LEAFROLL ASSOCIATED VIRUS***В.К. Котляр, О.Л. Себет, Е.Т. Ильницкая**V.K. Kotlyar, O.L. Seget, E.T. Ilnitskaya*

ФГБНУ "Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия", г. Краснодар, Россия, e-mail: mayyivva@gmail.com

FSBSI North Caucasus Federal Scientific Center of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia, e-mail: mayyivva@gmail.com

Аннотация. Вирус скручивания листьев винограда в настоящее время является одним из самых опасных фитопатологических заболеваний культуры винограда, оно занесено в список карантинных заболеваний ЕС и России. В статье рассмотрены проблемы распространения вируса скручивания листьев винограда в России и мире, рассмотрено его биоразнообразие в разных странах и способы борьбы. Приведена статистика по ущербу, который наносит данное фитопатологическое заболевание средним и крупным винодельческим хозяйствам. Уделено особое внимание важности ранней идентификации вируса скручивания листьев винограда с целью предотвращения его дальнейшего распространения и важнейшему звену в проведении RT-PCR, выделению РНК вируса из растительного материала.

Summary. The grapevine leafroll-associated virus is currently one of the most dangerous phytopathological diseases of grapevine culture, it is listed to the list of quarantine diseases of the EU and Russia. The article deals with the problems of the spread of the grapevine leafroll-associated virus in Russia and in the world, its biodiversity in different countries and ways of control are considered. Statistics on the damage caused by this phytopathological disease to medium and large wineries are given. Special attention is paid to the importance of early identification of the grapevine leafroll-associated virus in order to prevent its further spread and to the most important link in RT-PCR, the isolation of the virus RNA from plant material.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, GLRaV, идентификация патогена, выделение РНК, секвенирование

Keywords: Real-time PCR, GLRaV, pathogen identification, RNA isolation, sequencing

DOI: 10.32904/2712-8245-2023-23-9-15

Введение. Статья посвящена изучению распространенности вируса скручивания листьев винограда 1, 2 и 3 (GLRaV-1, -2, -3) на территории Краснодарского Края. Проведено сравнение его разнообразия с разновидностями этого вируса, обнаруженного на территории разных стран.

Рассмотрен мировой опыт в идентификации вируса скручивания листьев, основные методы его выделения, биоразнообразие и новейшие исследования по оздоровлению.

Обсуждение. Скручивание листьев винограда является одним из наиболее широко распространенных и вредоносных заболеваний виноградной лозы, которое приводит к снижению урожайности инфицированных виноградников на 15–40 %. Возбудителем является вирус скручивания листьев винограда рода *Ampelovirus*. Выделяют несколько типов вируса, которые обозначаются цифровыми значениями GLRaV-1, -2, -3 и т.д., до GLRaV-9.

Внешне болезнь проявляется в изменении окраски листьев (покраснение у сортов с окрашенными ягодами, пожелтение – с белыми ягодами), главные жилки листа остаются зелеными, листовая поверхность гофрированная [1].

Из-за наличия этого патогена в насаждениях формирование ягод проходит не до конца – они плохо вызревают и остаются мелкими. Кроме этого, содержание простых углеводов в их соке снижается на 5–26 %, ухудшается внешний вид гроздей и их окраска [2]. По данным Sh. Atallah et al. [3] размер потерь от вирусной инфекции данного типа может достигать 25–40 тыс. долл/га.

Проведенный в 2014–2019 гг. масштабный фитосанитарный мониторинг виноградников в Краснодарском, Ставропольском краях и Республике Крым выявил широкое распространение вирусной инфекции в плодоносящих насаждениях [4]. Около 50 % растений (в выборках) были заражены хотя бы одним из исследованных вирусов – GRSPaV, GVA, GLRaV1, GLRaV2, GLRaV3, GFLV, GFkV [5].

В исследовании, проведенном научным коллективом отечественных учёных, из всех проверенных образцов 54,5 % оказались положительными хотя бы на один из вирусов (GRSPaV, GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GFLV, GFkV) в Ставропольском крае, 49,8 % в Краснодарском крае и 49,5 % в Республике Крым. Установлено, что некоторые растения заражены одновременно несколькими типами вирусов [6].

На данный момент вирус скручивания листьев винограда зафиксирован в большинстве регионах, занимающихся выращиванием винограда в промышленных масштабах. В таблице 1 представлена краткая статистика по распространению разных видов вируса скручивания листьев в мире.

Стоит отметить, что первые сообщения об обнаружении вируса скручивания листьев датируются 2004–2006 годом за рубежом, а в России он был зафиксирован лишь в 2019 году. Вирус скручивания листьев винограда типа 1 и 3 (GLRaV-1 и GLRaV-3) был обнаружен в Крыму, что, вероятно, способствовало дальнейшему распространению данного патогена по южным винодельческим регионам [7]. Лидером по количеству обнаруженных разновидностей вируса GLRaV является США.

Интенсивное использование вида *V. rupestris*, завезенного в Европу из Америки в прошлом веке в качестве подвоя, с целью уменьшения поражения сортов винограда *V. vinifera* филлоксерой, способствовало распространению различных вирусов в основных районах выращивания винограда в Италии. Было выявлено наличие GLRaV-1 и GLRaV-3 у автохтонных сицилийских сортов, что также можно объяснить массовым использованием *V. rupestris* [8].

На сегодняшний день европейские сорта винограда (*V. vinifera*) не обладают естественной устойчивостью к вирусу скручивания листьев. Таким образом, нецелесообразно получать устойчивые линии с помощью традиционной селекции или программ внутривидового скрещивания, что накладывает серьезные ограничения на борьбу с данной болезнью.

Таблица 1. Распространенность вируса скручивания листьев винограда в мире (по литературным данным)

GLRaV-1	Турция, США, Россия, Китай, Южная Африка, Италия, Испания, Чили, Австралия, Хорватия, Индия [9]
GLRaV-2	Турция, США, Россия, Китай, Южная Африка, Италия, Испания [10, 11]
GLRaV-3	Турция, Новая Зеландия, США, Россия, Испания, Китай, Южная Африка, Италия, Испания, Португалия, Чили, Хорватия, Австралия, Украина [12, 13]
GLRaV-4	США, Южная Африка, Англия, Китай, Испания [14, 15]
GLRaV-5	США, Южная Африка, Англия, Китай, Турция, Чили [16, 17]
GLRaV-6	Южная Африка, Австралия [18]
GLRaV-7	Турция, Китай, Чили [19]
GLRaV-8	США [20]
GLRaV-9	США, Чили, Австралия [21, 22]

Одним из основных переносчиков вируса скручивания листьев винограда является виноградный мучнистый червец (*Planococcus ficus*). Также передача вируса скручивания листьев происходит при производстве посадочного материала винограда с использованием инфицированных растений, у которых внешние симптомы ещё не проявились [23].

В 2013 году в Институте виноградарства и виноделия им. В.Е. Таирова были разработаны критерии оценки проявления симптомов вирусов скручивания листьев и бороздчатости древесины. Предложена пятибалльная шкала оценки степени проявления симптомов (изменение окраски и скручивание листовой пластинки на кусте) – от единичных пораженных листьев на побегах (1 балл) до проявления симптомов практически на всех побегах пораженного куста (5 баллов) [24].

Однако, в связи с осложненной визуальной идентификацией этого вирусного заболевания, огромное значение имеет точная и ранняя диагностика ввозимого и размножаемого посадочного материала.

Одним из самых современных и точных методов идентификации вирусов винограда в настоящее время является метод обратной транскрипции с проведением последующей ПЦР в реальном времени или же Real time-PCR. Важнейшим критерием для проведения качественного и точного анализа является качество и концентрация РНК (нг/мкл) в выделенном из растительного материала препарате [25–28].

Исследователи из Канады, проводившие свои эксперименты в 2021–2022 году, подчеркнули, что анализы RT-qPCR (количественная ПЦР в реальном времени) быстрее, менее трудоемки и обычно обеспечивают

значительно большую специфичность и чувствительность, чем обычные тесты с помощью RT-PCR [29].

В 2022 году коллективом турецких ученых были проведены исследования изолятов GLRaV-3. На основе частичных генов гомолога белка теплового шока 70 (Hsp70h), частичного белка оболочки (CP) и частичной РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp), с помощью анализа RT-PCR (ПЦР в реальном времени) и изолятов, секвенировали различные гены и сравнивали их с изолятами, зарегистрированными в Genbank [30].

Это исследование подчеркивает широкую гетерогенность изолятов GLRaV-3, что коррелирует с общемировыми исследованиями.

На сегодняшний день общедоступны последовательности только семи полноразмерных геномов GLRaV-1 из США, Франции, Чехии и Канады. Доступность секвенированных последовательностей генома оказывает большое влияние на разработку праймеров для специфичной идентификации вируса.

В своём недавнем исследовании испанские учёные получили и включили в Genbank три новые почти полные последовательности генома патогена из разных географических регионов Греции, Испании и Словакии, тем самым значительно увеличив доступную информацию о геноме GLRaV-1. На основе полученных сиквенсов у них получилось создать метод, основанный на дуплексной реакции, включающая амплификацию внутреннего контроля растения, гена PEP виноградной лозы, для выявления предполагаемых ложноотрицательных результатов [31].

Итальянские ученые в 2021 году проводили масштабные исследования и разработали новый вид специфической количественной ПЦР в реальном времени для вируса скручивания листьев винограда [32].

Несмотря на широкое применение серологических и молекулярно-генетических методов, эти методики имеют некоторые ограничения, так как являются дорогостоящими, требуют времени и квалифицированного персонала. По этой причине сегодня требуются инновационные инструменты, подходящие для использования в полевых условиях, особенно если учесть всемирное распространение фитопатологических заболеваний разной этиологии, чему способствует глобализированный рынок саженцев и интродукция сортов винограда на территорию тех стран, где такие сорта ранее отсутствовали.

Обращаясь к зарубежному опыту, стоит отметить следующие новейшие исследования.

Коллектив итальянских ученых в 2022 году разработали недорогой портативный анализ LOC, основанный на датчиках электрохимической импедансной спектроскопии, способный обнаруживать GLRaV-3 при более низких концентрациях, чем тесты ELISA. Ожидается, что датчики LOC станут полезными инструментами для питомников/винодельческих компаний и фитопатологов с возможностью проводить анализ в полевых условиях, экономить реагенты, а также расширять свое применение для обнаружения других вирусов виноградной лозы [33].

В настоящее время одним из методов борьбы с вирусом скручивания листьев винограда и способом оздоровления посадочного материала является *in vitro*, широко изучаемое и практикуемое во всех основных винодельческих регионах [34–37]. Базируется этот метод оздоровления на получении в условиях *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру. В основе приема лежит уникальная способность растительной клетки реализовать присущую ей тотипотентность, то есть под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму.

В целом технология микроклонального размножения винограда разработана и позволяет получить однородный посадочный материал в большом количестве. Однако, при использовании метода в промышленных масштабах существует ряд трудностей. С учетом генотипических особенностей каждого сорта, вводимого в культуру *in vitro*, требуется подбор индивидуального состава питательных сред. Одной из основных проблем при оздоровлении сортообразцов винограда методом культуры *in vitro* является невозможность получения регенерантов из всех типов эксплантов при использовании универсальной питательной среды. Так как различные типы эксплантов показывают неодинаковую эффективность в получении регенерантов, либо вообще не переходят к органогенезу. Данный метод является крайне затратным по времени и ресурсам и не исключает возможность повторного заражения вирусом оздоровленных ранее саженцев.

Заключение. Вирус скручивания листьев винограда в настоящее время является одним из самых опасных фитопатологических заболеваний культуры винограда, оно занесено в список карантинных заболеваний ЕС и России.

Однако, даже несмотря на усиление фитосанитарного надзора, мероприятия по оздоровлению и обязательную сертификацию ввозимого посадочного материала, этот вирус широко распространен на виноградниках Краснодарского Края и Крыма и сдержать рост его распространения не представляется возможным. Похожая ситуация складывается и за рубежом.

Именно поэтому во всем мире проводятся глобальные молекулярно-генетические исследования, посвященные новым методам идентификации этого патогена. Своевременная отбраковка зараженного посадочного материала – является залогом здоровья виноградников и способна сэкономить средства винодельческих хозяйств.

Литература

1. Grapevine leafroll-associated virus 3 / H.J. Maree, R.P.P. Almeida, R. Bester, K.M. Chooi, D. Cohen, V.V. Dolja, M.F. Fuchs., D.A. Golino, A.E.C. Jooste, G.P. Martelli, R.A. Naidu, A. Rowhani, P. Saldarelli, J.T. Burger // *Frontiers in Microbiology*. New York. 2013. Vol.4. n.82. pp.1–2.
2. Martelli G.P. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents // *Journal of Plant Pathology*. 2014. Т. 96. №. 1 sup. pp. 1–136.

3. Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. / Sh. Atallah, M. Gomez, M Fuchs, T. Martinson // *American Journal of Enology and Viticulture*. 2012. 63. pp. 73-79.
4. Occurrence of Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 in Crimea / E.V. Porotikova, V.I. Risovannaya, Y.A. Volkov, U.D. Dmitrenko, V.A. Volodin, S.M. Gorislavets, E.P. Stranisheskaya, A.A. Agranovsky, A.M. Kamionskaya, S.V. Vinogradova // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016, 71, pp. 76–79.
5. First Report of Grapevine Leafroll-Associated Virus 2 in Russian Grapevines (*Vitis Vinifera*) / E.V. Porotikova, U.D. Dmitrenko, E.G. Yurchenko, S.V. Vinogradova // *Plant Dis.* 2018. № 103. pp. 164.
6. Distribution and Genetic Diversity of Grapevine Viruses in Russia / E. Porotikova, U. Terehova, V. Volodin, E. Yurchenko, S. Vinogradova // *Plants*. 2021. № 10 (6). pp. 1080.
7. Распространение вирусов скручивания листьев винограда 1 и 3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 и -3) на территории Крыма / Е.В. Поротикова, В.И. Рисованная, Я.А. Волков, Ю.Д. Дмитренко, В.А. Володин, Е.П. Странишевская, С.В. Виноградова // *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология*. 2016. № 2. pp. 13–16.
8. Epidemiological Survey of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 and 3 in Sicily (Italy): Genetic Structure and Molecular Variability / A.G. Caruso, S. Bertacca, A. Ragona, S. Matić, S. Davino, S. Panno // *Agriculture*. 2022. №12 (5). pp. 647.
9. First report of Grapevine leafroll-associated virus 1 infecting grapevines in India / S. Kumar, S.D. Sawant, I.S. Sawant, K. Prabha, R.K. Jain, V.K. Baranwal // *Plant Disease*. 2012. № 96 (12). pp. 1828–1828.
10. First Report of Grapevine leafroll-associated virus 2 in Russian Grapevines (*Vitis vinifera*) / E.V. Porotikova, U.D. Dmitrenko, E.G. Yurchenko, S.V. Vinogradova // *Plant Disease*. 2019. № 103 (1). pp.164–164.
11. Aboughanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S. First report of Grapevine leafroll-associated virus 2 infecting muscadine (*Vitis rotundifolia*) and summer grape (*Vitis aestivalis*) in the United States // *Plant Disease*. 2015. T. 99. №. 1. pp. 163–163.
12. First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine / L.T. Mishchenko, L.O. Konup, A.A. Dunich, V.F. Gorobets, A.I. Konup, N.V. Zaimenko, R.S. Sovinska // *Journal of Plant Diseases and Protection*. 2022. pp. 1–10.
13. Soule M.J., Eastwell K.C., Naidu R.A. First report of Grapevine leafroll associated virus-3 in American *Vitis* spp. Grapevines in Washington State // *Plant Disease*. 2006. T. 90. №. 11. pp. 1461–1461.
14. First report of Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4) in Spain / C.V. Padilla, E. Cretazzo, N. López, B.G. de Rosa, V. Padilla, L. Velasco // *New Disease Reports*. 2010. № 21(1). pp. 21–21.
15. First Report of Grapevine leafroll-associated virus 4 and 5 in Grapevines in China / G.Q. Pei, Y.F. Dong, Z.P. Zhang, X.D. Fan // *Plant Disease*. 2010. № 94 (1). pp. 130.
16. First Report of the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus-5 in Turkish Vineyards / N. Buzkan, S. Karadağ, A. Kaya, S. Baloğlu, A. Minafra, Y. Ben-Dov // *Journal of Phytopathology*. 2010. № 158(6). pp. 448–449.
17. First report on the occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 5 in Chilean grapevines / E.A. Engel, P.F. Escobar, P.A. Rivera, P.D.T. Valenzuela // *Plant Disease*. 2010. № 94(8). pp.1067–1067.
18. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* / J. Le Maguet, M. Beuve, E. Herrbach, O. Lemaire // *Phytopathology*. 2012. № 102(7). pp. 717–723.
19. Lyu M.D. First report of Grapevine leafroll-associated virus 7 in two native grape varieties in China // *Plant Disease*. 2013. T. 97. №. 1. pp. 150–150.
20. First report on the occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 7 and 9 in Chilean grapevines / E.A. Engel, P. Escobar, C. Montt, S. Gómez-Talquenca, P.D.T. Valenzuela // *Plant Disease*. 2008. № 92 (8). pp.1252–1252.

21. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family / G.P. Martelli, N.A. Ghanem-Sabanadzovic, A.A. Agranovsky, M.A. Rwahnih, V.V. Dolja, C.I. Dovas, P. Saldarelli // *Journal of Plant Pathology*. 2012. pp. 7–19.
22. First report of grapevine leafroll associated virus 9 (GLRaV-9) in Western Australia. Australasian / B.K. Peake, A.E. Mackie, K. Sivasithamparam, N. Habili, S.J. McKirdy // *Plant Pathology*. 2004. № 33. pp. 445–446.
23. Viruses and virus diseases of grapevine in Lebanon / M.M. Haidar, M. Diglaro, W. Khoury, V. Savino // *EPPO Bull.* 1996. Vol. 26. N 1. pp. 147–153.
24. Критерии оценки поражения скручиванием листьев и комплексом бороздчатости древесины в системе санитарного контроля сертифицированного посадочного материала винограда / Н. Мулюкина, Н. Николаева, Д. Лосева, А. Хохлов // *In Horticultură, Viticultură și vinificație*. 2013. Vol. 36. pp. 210–214.
25. Совершенствование метода выделения РНК-вирусов из растений винограда / В.К. Котляр, С.В. Федорович, Е.А. Кожевников, Е.Т. Ильницкая // *Научные труды Северо-Кавказского федерального научного центра садоводства, виноградарства, виноделия*. 2022. Т. 35. С. 18–22.
26. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents / N. Astruc, J.F. Marcos, G. Macquaire, T. Candresse, V. Pallás // *European Journal of Plant Pathology*. 1996. Т. 102. № 9. pp. 837–846.
27. MacKenzie D.J. A standard protocol for the detection of viruses and viroids using a reverse transcription-polymerase chain reaction technique // *The Canadian Food Inspection Agency*. 1997.
28. Song Y., Hanner R.H., Meng B. Genome-wide screening of novel RT-qPCR reference genes for study of GLRaV-3 infection in wine grapes and refinement of an RNA isolation protocol for grape berries // *Plant Methods*. 2021. Т. 17. pp. 1–20.
29. Development of a one-step RT-qPCR assay for the detection of Grapevine leafroll-associated virus 7 / H.S. Bennypaul, D.S. Sanderson, P. Donaghy, I. Abdullahi, M. Green, V. Klaassen, M. Al Rwahnih // *Journal of Virological Methods*. 2022. № 308. pp. 114578.
30. Incidence and genetic diversity of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) isolates in Turkey / M. Gazel, B. Tunç, E. Elçi, K. Çağlayan // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2022. № 122. pp. 101896.
31. A Novel and Highly Inclusive Quantitative Real-Time RT-PCR Method for the Broad and Efficient Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 / F. Morán, A. Olmos, M. Glasa, M.B.D. Silva, V. Maliogka, T. Wetzel, A.B. Ruiz-García // *Plants*. 2023. № 12(4). p. 876.
32. Bueno Da Silva M. Improvement of Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 Detection through a Novel Specific Quantitative Real-Time RT-PCR // *Plants*. 2021. № 123. p. 341.
33. Detection of Ampelovirus and Nepovirus by Lab-on-a-Chip: A Promising Alternative to ELISA Test for Large Scale Health Screening of Grapevine. Biosensors / I. Buja, E. Sabella, A.G. Monteduro, S. Rizzato, L.D. Bellis, V. Elicio, G. Maruccio // *Phytopathology*. 2022. № 12(3). p.147.
34. Saygac S., Onder S. Effects of shoot tip size on in vitro regeneration and virus elimination of grapevine cv. superior seedless // *Plant Protection Bulletin*. 2021. Т. 61. № 3. pp. 5–9.
35. Cultivar and Phenological Stage Effects on the Success of In Vitro Meristem Culture and GLRaV-3 Elimination of Croatian Autochthonous Grapevine Cultivars / Z. Marković, A. Zrilić, I. Šikuten, P. Štambuk, I. Tomaz, D. Vončina, D. Preiner // *Agronomy*. 2021. № 11(7). p. 1395.
36. Occurrence of Grapevine Leafroll-Associated Virus-3 (GLRaV-3), Complete Nucleotide Sequence and Cultivar Susceptibility to a GLRaV-3 Isolate from Shaanxi Province of China / X. Hao, B. Jiao, Y. Wang, B. Shang, Y. Xu // *Horticulturae*. 2022. Т.8. №.1. pp. 73.
37. Grapevine leafroll-associated virus 3 genotype influences foliar symptom development in New Zealand vineyards / K.M. Chooi, V.A. Bell, A.G. Blouin, D. Cohen, D. Mundy, W. Henshall, R.M. MacDiarmid // *Viruses*. 2022. № 14(7). pp.1348.