

Марина Викторовна Макаркина^{1✉}, Елена Тарасовна Ильницкая²,
Евгений Анатольевич Кожевников³, Татьяна Дмитриевна Козина⁴

^{1,2,3,4}Северо-Кавказский ФНЦ садоводства, виноградарства, виноделия, Краснодар, Россия

¹konec_citatu@mail.ru

²ilnitskaya79@mail.ru

³zhenya.kozhevnikov.2017@bk.ru

⁴tiaanta@yandex.ru

АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФИТОПЛАЗМ ПОЧЕРНЕНИЯ ДРЕВЕСИНЫ И ЗЛОТИСТОГО ПОЖЕЛТЕНИЯ НА ВИНОГРАДНИКАХ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ

Цель исследования – изучить распространение фитоплазменной инфекции на виноградниках Краснодарского края методом ПЦР. Объект исследования – растения винограда различных сортов с внешними симптомами заражения фитоплазменной инфекцией. Материалом для экстракции тотальной ДНК послужили симптоматизированные листья (их жилки и черешки), собранные в насаждениях сортов Шираз, Шардоне, Каберне Совиньон, Саперави, Мицар, Молдова, Августин, Пино блан, Рислинг, Алиготе. Экстракцию ДНК производили с использованием буфера на основе катионного детергента ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид), по протоколу, рекомендованному ЕРРО (European plant protection organization) для выделения фитоплазм из растительного материала винограда. Отбор проб производился на промышленных виноградниках Краснодарского края в 9 различных географических точках Новороссийского, Темрюкского и Анапского районов. ДНК выделяли из симптоматизированных листьев по протоколу, рекомендованному ЕРРО (European plant protection organization). Определение наличия фитоплазменной инфекции проводилось методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе Quant Studio 5 с использованием коммерческого набора, предназначенного для выявления фитоплазм – *Candidatus Phytoplasma solani* и *Candidatus Phytoplasma vitis* (Синтол) и тест-системы, рекомендованной ЕРРО. С помощью набора производства «Синтол» проанализировано 239 образцов, в т. ч. 12 перепроверено маркерами, рекомендованными ЕРРО. В результате проведенного анализа было установлено, что в 113 исследованных образцах присутствует ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*. ДНК фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma vitis*, вызывающей золотистое пожелтение листьев, не была обнаружена ни в одном из проанализированных образцов.

Keywords: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma vitis*, ПЦР в реальном времени

Для цитирования: Анализ распространения фитоплазм почернения древесины и золотистого пожелтения на виноградниках Краснодарского края / М.В. Макаркина [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2024. № 1. С. 95–100.

Благодарности: исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-26-00267.

Marina Viktorovna Makarkina^{1✉}, Elena Tarasovna Ilnitskaya², Evgeny Anatolyevich Kozhevnikov³,
Tatyana Dmitrievna Kozina⁴

^{1,2,3,4}North Caucasus FSC for Horticulture, Viticulture, Winemaking, Krasnodar, Russia

¹konec_citatu@mail.ru

²ilnitskaya79@mail.ru

³zhenya.kozhevnikov.2017@bk.ru

⁴tiaanta@yandex.ru

ANALYSIS OF THE BOIS NOIR AND FLAVESCENCE DORÉE PHYTOPLASMAS DISTRIBUTION IN VINEYARDS OF THE KRASNODAR REGION

The purpose of research is to study the spread of phytoplasma infection in the vineyards of the Krasnodar Region using the PCR method. The object of the study is grape plants of various varieties with external symptoms of phytoplasma infection. The material for total DNA extraction was symptomatic leaves (their veins and petioles) collected from plantings of Shiraz, Chardonnay, Cabernet Sauvignon, Saperavi, Mizar, Moldova, Augustine, Pinot Blanc, Riesling, and Aligote varieties. DNA extraction was carried out using a buffer based on the cationic detergent CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), according to the protocol recommended by EPPO (European plant protection organization) for the isolation of phytoplasmas from grape plant material. Sampling was carried out in industrial vineyards of the Krasnodar Region in 9 different geographical locations of the Novorossiysk, Temryuk and Anapa Regions. DNA was isolated from symptomatic leaves according to the protocol recommended by EPPO (European plant protection organization). Determination of the presence of phytoplasma infection was carried out by real-time PCR on a Quant Studio 5 amplifier using a commercial kit designed to detect phytoplasmas – *Candidatus Phytoplasma solani* and *Candidatus Phytoplasma vitis* (Synthol) and a test system recommended by EPPO. Using a kit produced by Synthol, 239 samples were analyzed, including 12 rechecked with markers recommended by EPPO. As a result of the analysis, it was found that DNA of *Candidatus Phytoplasma solani* was present in 113 samples studied. DNA from the phytoplasma *Candidatus Phytoplasma vitis*, which causes golden yellowing of leaves, was not detected in any of the analyzed samples.

Keywords: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma vitis*, Real time PCR

For citation: Analysis of the bois noir and flavescence dorée phytoplasmas distribution in vineyards of the Krasnodar Region / M.V. Makarkina [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2024;(1): 95–100. (In Russ.).

Acknowledgments: research has been carried out with the financial support of the Russian Science Foundation № 23-26-00267.

Введение. Фитоплазмы – это патогенные микроорганизмы растений, относящиеся к классу *Mollicutes*, вызывающие разрушительные заболевания различных сельскохозяйственных культур во всем мире. Они являются облигатными паразитами, ограниченными тканями флоэмы растения-хозяина [1].

Для виноградной лозы заболеваниями, вызываемыми фитоплазмами, являются почернение древесины (Bois noir – BN) и золотистое пожелтение (Flavescence dorée – FD). FD (карантинный объект на территории Российской Федерации) наносит серьезный ущерб виноградникам в Европе.

Симптомы, которые BN и FD вызывают на виноградной лозе, визуально неразличимы и включают скручивание листьев вниз, сопровождающееся изменением их цвета, неравномерное или полное отсутствие одревеснения побегов, увядание гроздей и сморщивание ягод [2]. Несмотря на идентичные симптомы, BN и FD связаны с генетически различными фитоплазмами – *Candidatus Phytoplasma solani* (подгруппа 16SrXII-A) и *Candidatus Phytoplasma vitis* (группа 16SrV) соответственно. Провести видовую идентификацию патогена можно только при помощи молекулярно-

генетических методов, что особенно важно для мониторинга Flavescence dorée – карантинного заболевания винограда [3].

Фитопlasма почернения древесины винограда передается виноградной лозе в основном *Hyalesthes obsoletus* Signoret, многоядной цикадкой, завершающей свой биологический цикл преимущественно на травянистых растениях [4, 5]. BN молекулярно-генетическими методами в Краснодарском крае было впервые обнаружено в 2018 г. [6].

Фитопlasма золотистого пожелтения винограда переносится североамериканской цикадкой *Scaphoideus titanus* Ball [7]. В настоящее время в России не было установлено случаев заболевания винограда золотистым пожелтением, однако в Краснодарском крае, Донецкой области и в Крыму была обнаружена цикадка *S. titanus* [8–10]. В связи с этим важно мониторить распространение данного заболевания в России.

Цель исследования – изучить распространение фитоплазменной инфекции на виноградниках Краснодарского края методом ПЦР.

Объекты и методы. Объектом исследования являются виноградные растения различных сортов, имеющие внешние симптомы фито-

плазменной инфекции (рис.), отобранные на промышленных виноградниках в 9 различных географических точках Краснодарского края Темрюкского, Анапского и Новороссийского районов (зоны основного размещения вино-

градников в крае). Отбор материала производился в период с третьей декады июня по вторую декаду сентября 2023 г., было отобрано 239 растительных образцов для ПЦР-анализа.



Растение винограда, пораженное фитоплазмой (сорт Алиготе, Темрюкский р-н)

Материалом для экстракции тотальной ДНК послужили симптомированные листья (их жилки и черешки), собранные в насаждениях сортов Шираз, Шардоне, Каберне Совиньон, Саперави, Мицар, Молдова, Августин, Пино блан, Рислинг, Алиготе. Экстракцию ДНК производили с использованием буфера на основе катионного детергента ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид), по протоколу, рекомендованному ЕРРО (European plant protection organization) для выделения фитоплазм из растительного материала винограда [11]. Анализ препаратов тотальной ДНК на наличие фитоплазменной инфекции осуществляли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе QuantStudio 5 (Сингапур) при помощи коммерческого набора для идентификации возбудителей фитоплазм почернения древесины и золотистого пожелтения (ООО «Синтол», Россия, Москва), а также ряд образцов проанализированы с использованием тест-системы, рекомендованной ЕРРО [11]. Реакционные смеси, общим объемом 25 мкл, включали стандартные компоненты для ПЦР-РВ, реализуемой по технологии TaqMan, в концентрациях, объемах и пропорциях, рекомендованных разработчиками используемых идентификационных систем.

Условия ПЦР-РВ устанавливали исходя из протоколов, описанных разработчиками идентификационных систем. Достоверность положительных результатов оценивали исходя из следующих критериев: наличие и значение порогового цикла (С_t) – не выше 40, морфология кривых амплификации, суммарное значение сигнала и его изменение за цикл, наличие и идентичность кривых амплификации внутреннего контроля реакции, отсутствие специфической амплификации в отрицательных контрольных образцах. А также для сопоставления результатов часть образцов была проанализирована праймерами, рекомендованными ЕРРО.

Результаты и их обсуждение. На данный момент на наличие фитоплазменной инфекции проанализировано 239 образцов с помощью набора производства «Синтол», в т. ч. 12 образцов маркерами, рекомендованными для использования ЕРРО. В 113 образцах (47 % исследованного материала) обнаружена ДНК *Candidatus Phytoplasma solani*. Фитопlasма золотистого пожелтения *Candidatus Phytoplasma vitis* не обнаружена ни в одном из проанализированных образцов.

Во всех точках сбора материала молекулярно-генетическим методом подтверждено наличие

виноградных растений, пораженных фитоплазмой почернения древесины Bois noir. Концентрация патогена различна: Ст – от 22 до 38. Отмечается корреляция между интенсивностью морфологических симптомов фитоплазменной инфекции и пороговым циклом ПЦР, которые в свою очередь имеют связь со сроками отбора материала. Так, наибольший процент (100 %) положительных результатов, наравне с наиболее

ранними Ст, среди проанализированных образцов отмечен по сортам Шардоне, Алиготе, Рислинг и Пино блан в Новороссийском и Темрюкском районах – отбор материала проводился в августе–сентябре. А наименьший процент выявленных положительных реакций выявлен по сортам Мицар (Анапский р-н), Саперави и Молдова (Темрюкский р-н), материал с которых отбирался в конце июня (табл.).

Результаты диагностики фитоплазменных заболеваний на виноградниках Краснодарского края

Место сбора образцов, сорт	Всего проанализировано образцов	BN	FD	Отрицательно	Процент положительных результатов
Новороссийск, точка сбора 1; Шираз	8	5	0	3	62,5
Новороссийск, точка сбора 1; Шардоне	8	5	0	3	62,5
Новороссийск, точка сбора 1; Каберне Совиньон	8	6	0	2	75
Новороссийск, точка сбора 1; Шардоне	8	8	0	0	100
Новороссийск, точка сбора 2; Пино блан	12	12	0	0	100
г.-к Анапа, точка сбора 3; Мицар	43	14	0	29	32,5
г.-к Анапа, точка сбора 4; Шардоне	29	13	0	16	44,8
Темрюкский р-н, точка сбора 5; Саперави	38	11	0	27	28,9
Темрюкский р-н, точка сбора 6; Молдова	30	9	0	21	30
Темрюкский р-н, точка сбора 6; Рислинг	10	10	0	0	100
Темрюкский р-н, точка сбора 7; Августин	13	5	0	8	38,5
Темрюкский р-н, точка сбора 8; Алиготе	10	5	0	5	50
Темрюкский р-н, точка сбора 9; Алиготе	22	10	0	12	46,5

При анализе результатов, полученных при использовании коммерческого набора и тест-системы EPPO, данные оказались сопоставимы: положительные результаты наличия патогена в соответствующих образцах, а также пороговые циклы обнаружения патогена находятся на одних и тех же значениях.

Заключение. Проведен мониторинг фитоплазменных инфекций – почернения древесины Bois noir и золотистого пожелтения Flavescence dorée на виноградниках Краснодарского края с помощью ДНК-маркерных тест-систем. Возбудитель фитоплазмы почернения древесины *Candidatus Phytoplasma solani* выявлен во всех точках сбора материала в Темрюкском, Ново-

российском и Анапском районах Краснодарского края; фитопlasма золотистого пожелтения *Candidatus Phytoplasma vitis* нами не обнаружена. Исследования по анализу распространения данных фитоплазм продолжаются.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Lee I.M., Zhao Y., Davis R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas // *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford: CABI, 2010. P. 51–63.
2. Grapevine phytoplasmas / E. Angelini [et al.] // *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – I, Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma – Associated Diseases*. Springer, Singapore, 2018. P. 123–152.
3. Identification of phytoplasmas associated with grapevine 'bois noir' and flavescence dorée in inter-row groundcover vegetation used for green manure in Franciacorta vineyards / A. Moussa [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. 2023. Vol. 1. P. 1–9.
4. Geographical and Temporal Diversity of '*Candidatus Phytoplasma solani*' in Wine-Growing Regions in Slovenia and Austria / N. Mehle [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 889675.
5. Alma A., Lessio F., Nickel H. Insects as phytoplasma vectors: Ecological and epidemiological aspects // *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – II, Transmission and Management of Phytoplasma – Associated Diseases*. Springer: Singapore, 2019. P. 1–25.
6. Porotikova E., Yurchenko E., Vinogradova S. First Report of '*Candidatus Phytoplasma solani*' Associated with Bois Noir on Grapevine (*Vitis vinifera*) in Krasnodar Region of Russia // *Plant Disease*. 2019. Vol.104. P. 227.
7. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences / I.M. Lee [et al.] // *International journal of systematic bacteriology*. 1998. Vol. 48. P. 1153–1169.
8. Gnezdilov V.M., Orlov O.V. First Record of *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (*Hemiptera, Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae*), a Vector of flavescence dorée of Grapevine, from Ciscaucasia // *Entomological Review*. 2022. Vol. 102. P. 108–109.
9. Мартынов В.В., Никулина Т.В. *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (*Hemiptera: Cicadellidae*) – новый инвазивный вредитель винограда на территории Донбасса // *Биология растений и садоводство: теория, инновации*. 2019. № 153. С. 49–57.
10. Хамаева Б.Б., Бондаренко Г.Н., Радионовская Я.Э. Изучение видового состава цикадовых (*Auchenorrhyncha*) в ампелоценозах Республики Крым // *Фитосанитария. Карантин растений*. 2022. № 3. С. 45–52.
11. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/079 (2) Grapevine flavescence dorée phytoplasma // *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2016. Vol. 46 (1). P. 78–93.

References

1. Lee I.M., Zhao Y., Davis R.E. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas // *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors*. Wallingford: CABI, 2010. P. 51–63.
2. Grapevine phytoplasmas / E. Angelini [et al.] // *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – I, Characterisation and Epidemiology of Phytoplasma – Associated Diseases*. Springer, Singapore, 2018. P. 123–152.
3. Identification of phytoplasmas associated with grapevine 'bois noir' and flavescence dorée in inter-row groundcover vegetation used for green manure in Franciacorta vineyards / A. Moussa [et al.] // *Journal of Plant Pathology*. 2023. Vol. 1. P. 1–9.
4. Geographical and Temporal Diversity of '*Candidatus Phytoplasma solani*' in Wine-Growing Regions in Slovenia and Austria / N. Mehle [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. 2022. Vol. 13. P. 889675.
5. Alma A., Lessio F., Nickel H. Insects as phytoplasma vectors: Ecological and epidemiological aspects // *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria – II, Transmission and Management of Phytoplasma – Associated Diseases*. Springer: Singapore, 2019. P. 1–25.
6. Porotikova E., Yurchenko E., Vinogradova S. First Report of '*Candidatus Phytoplasma solani*' Associated with Bois Noir on Grapevine (*Vitis vinifera*) in Krasnodar Region of Russia // *Plant Disease*. 2019. Vol.104. P. 227.
7. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA

- and ribosomal protein gene sequences / I.M. Lee [et al.] // International journal of systematic bacteriology. 1998. Vol. 48. P. 1153–1169.
8. Gnezdilov V.M., Orlov O.V. First Record of *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (Hemiptera, Auchenorrhyncha: Cicadellidae: Deltocephalinae), a Vector of flavescence doree of Grapevine, from Ciscaucasia // Entomological Review. 2022. Vol. 102. P. 108–109.
 9. Martynov V.V., Nikulina T.V. *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 (Hemiptera: Cicadellidae) – novyj invazivnyj vreditel' vinograda na territorii Donbassa // Biologiya rastenij i sadovodstvo: teoriya, innovacii. 2019. № 153. S. 49–57.
 10. Hamaeva B.B., Bondarenko G.N., Radionovskaya Ya. E. Izuchenie vidovogo sostava cikadovyh (Auchenorrhyncha) v ampelocenozah Respubliki Krym // Fitosanitariya. Karantin rastenij. 2022. № 3. S. 45–52.
 11. European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/079 (2) Grapevine flavescence doree phytoplasma // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 2016. Vol. 46 (1). P. 78–93.

Статья принята к публикации 23.11.2023 / The article accepted for publication 23.11.2023.

Информация об авторах:

Марина Викторовна Макаркина¹, младший научный сотрудник лаборатории сортоизучения и селекции винограда

Елена Тарасовна Ильницкая², заведующая лабораторией сортоизучения и селекции винограда, кандидат биологических наук

Евгений Анатольевич Кожевников³, младший научный сотрудник лаборатории сортоизучения и селекции винограда

Татьяна Дмитриевна Козина⁴, младший научный сотрудник лаборатории сортоизучения и селекции винограда

Information about the authors:

Marina Viktorovna Makarkina¹, Junior Researcher, Laboratory of Grape Varieties and Selection

Elena Tarasovna Ilitskaya², Head of the Laboratory for the Study and Selection of Grapes, Candidate of Biological Sciences

Evgeny Anatolyevich Kozhevnikov³, Junior Researcher, Laboratory of Grape Varieties and Selection

Tatyana Dmitrievna Kozina⁴, Junior Researcher, Laboratory of Grape Varieties and Selection

