

**ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ МОЛДОВЫ**

**ДОКТОРСКАЯ ШКОЛА  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ НАУКИ**

На правах рукописи  
УДК: 634.8[632+632.7](478)

**ХАУСТОВ ЕВГЕНИЙ**

**ЗАБОЛЕВАНИЯ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ  
ФИТОПЛАЗМЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ**

**411.09 ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ**

Автореферат диссертации на соискание учёной степени доктора  
сельскохозяйственных наук

**КИШИНЁВ, 2023**

**Работа выполнена в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля винограда Научно-Практического Института Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий (НПИСВиПТ)**

#### **411.09 ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ**

**Состав Комиссии по публичной защите докторской диссертации:**

**БАЛАН Валериан, председатель,** доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор университета, ТУМ;

**БОНДАРЧУК Виктор, научный руководитель,** доктор сельскохозяйственных наук, НПИСВиПТ;

**ТОДИРАШ Владимир, учёный секретарь,** доктор хабилитат биологических наук, конференциар исследователь, ИГФЗР;

**ВОЙНЯК Василий,** доктор хабилитат сельскохозяйственных наук, профессор университета, ИГФЗР;

**ТУМАНОВА Лидия, официальный рецензент,** доктор химических наук, конференциар исследователь, ИГФЗР;

**ЮРКУ-СТРАИСТАРУ Елена, официальный рецензент,** доктор сельскохозяйственных наук, конференциар университета, Институт Зоологии;

**ВОЛОЩУК Леонид, официальный рецензент,** доктор хабилитат биологических наук, профессор исследователь, ИГФЗР

Защита состоится 15 декабря 2023 года, в 13:00, на заседании Комиссии по публичной защите диссертации, в Научно-Практическом Институте Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий, г. Кодру, ул. Виерул, 59, каб. 206.

С докторской диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в Научно-технической библиотеке Технического Университета Молдовы и на веб-сайте Национального Агентства по Обеспечению Качества в Области Образования и Исследований ([www.cnaa.md/anasesc.md](http://www.cnaa.md/anasesc.md)).

Автореферат отправлен 13 октября 2023.

**Учёный секретарь:**

**ТОДИРАШ Владимир,** д-р. хаб. биол. наук., конф. исслед.

**Научный руководитель:**

**БОНДАРЧУК Виктор,** д-р с.-х. наук

**Автор**

**ХАУСТОВ Евгений**

## **КОНЦЕПТУАЛЬНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Актуальность темы.** Виноградарство является традиционной отраслью в экономике Республики Молдова. Увеличение доходности отрасли напрямую связано с повышением продуктивности виноградников. Характерной особенностью фитоплазменных инфекций винограда является поражение генеративных органов, вследствие чего урожай на поражённых побегах либо отсутствует, либо обладает плохим качеством, что значительно влияет на количество и качество урожая. Другой особенностью фитоплазмозов виноградной лозы является то, что больной однолетний прирост не вызревает от основания до верхушки и с наступлением низких температур погибает, что, в конечном счете, сказывается на долговечности виноградных кустов. Наиболее известными из них являются Золотистое пожелтение и Почернение древесины. Симптомы поражения на виноградном растении визуальны неотличимы, однако вызываются разными фитоплазмами. Поэтому, для принятия соответствующих мер борьбы, необходимо проводить исследования по определению заболевания, идентификации возбудителя и переносчиков.

Во всём мире фитоплазменные болезни наносят большой экономический ущерб сельскому хозяйству, в частности виноградарству, где фитоплазмоз винограда приводит к потере урожая от 30 и более процентов. Не принятие своевременных защитных мер в источниках появления фитоплазменной инфекции, заболевание распространяется с эпифитотическим характером и за несколько лет инфицирует 70-100% растений плантаций. Исходя из вышеизложенного, тема диссертации актуальна, имеет научное и практическое значение для виноградарства Республики Молдова.

### **Описание состояния в данной области и определение задач исследований.**

Массовый и бесконтрольный импорт посадочного материала в последние десятилетия, способствовал ввозу в страну новых вредителей и возбудителей заболеваний, которые в новых почвенно-климатических условиях и отсутствии естественных антагонистов, получили благоприятные условия для ускоренного размножения. Одним из таких примеров является фитоплазмоз виноградной лозы в Республике Молдова.

Почвенно-климатические условия Республики Молдова обуславливают сортимент винограда, технологию возделывания, а также растительный покров на виноградниках и прилегающих территориях. Республика Молдова находится в зоне континентального климата, характеризующегося низкими температурами в зимний и довольно высокими температурами в летний период года. В последние 10-15 лет в летний период наблюдаются продолжительные засухи, что существенно сказывается на развитии биоценозов на плантациях винограда. Ряд сорняков и кустарников могут служить резервуарами фитоплазм, а также растениями, благоприятными для питания насекомых-переносчиков. Виноградное растение для них может являться постоянным или временным в определенный период их жизненного цикла.

В настоящее время в Молдове отсутствуют маточники привойных лоз. Лозу для производства привитых саженцев заготавливают на промышленных плантациях винограда, которые в той или иной степени инфицированы фитоплазменным заболеванием. В данном случае возможно получение изначально инфицированных саженцев, использование которых при закладке плантаций винограда, способствует

образованию новых очагов заболеваний. Заболевания виноградной лозы фитоплазменной этиологии на плантациях винограда в Республике Молдова встречаются повсеместно, однако каким заболеванием и в какой степени они инфицированы не установлено. Для решения проблемы фитоплазменных заболеваний винограда необходимо в первую очередь провести исследования по определению вида заболевания и идентификации его возбудителя, а также установлению наличия переносчиков и выявления растений-резервуаров инфекции.

**Цель исследования:** цель работы состояла в определении ореалов распространения и степени поражения плантаций винограда фитоплазменным заболеванием, идентификации возбудителя, а также научного обоснования предложений по предупреждению его распространения в Республике Молдова. Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

1. определить масштабы и степень поражения плантаций винограда фитоплазменными заболеваниями в Республике Молдова;
2. определить вид заболевания виноградной лозы в РМ;
3. идентифицировать фитоплазму-возбудителя заболевания винограда в РМ;
4. установить переносчиков фитоплазменных заболеваний винограда в РМ;
5. выявить растения-резервуары фитоплазменных заболеваний винограда в РМ;
6. предложить научно-обоснованные меры по предупреждению распространения фитоплазменных заболеваний винограда в РМ.

**Гипотеза исследования:** Заболевания растений фитоплазменной этиологии, в естественных условиях, распространяют цикадки, причём каждое заболевание переносят определённые виды переносчиков. В связи с этим, рабочая гипотеза исследований основывалась на том, что широкое распространение фитоплазменного заболевания винограда в Республике Молдова возможно только при наличии активного переносчика. Поэтому исследования проводили в следующей последовательности: идентификация заболевания, установление цикад-переносчиков, выявление растений-резервуаров фитоплазмы.

**Методология научного исследования.** В процессе исследований применены следующие научные методы: качественный и количественный анализ, индукция, дедукция, синтез, сравнение, корреляция и регрессия, метод таблиц и хронологического сравнения. Степень поражения плантаций винограда фитоплазменными заболеваниями проводили методом маршрутных визуальных обследований в сроки наиболее четкого проявления симптомов. Мониторинг цикад осуществляли отловом насекомых энтомологическим сачком и липкими ловушками жёлтого цвета. Диагностика фитоплазменных заболеваний выполнена молекулярным методом Вложенной ПЦР. Для получения нуклеотидных последовательностей ДНК фитоплазмы в текстовом виде, использован метод секвенирования по Сэнгеру.

**Научная новизна и оригинальность, состоит в:**

- впервые в Республике Молдова диагностировано заболевание виноградной лозы фитоплазменной этиологии Почернение древесины - *Bois noir*. Заболевание обнаружено во всех зонах промышленного возделывания винограда;

- впервые в Республике Молдова идентифицирован возбудитель заболевания Почернение древесины винограда *Candidatus Phytoplasma solani*;
- впервые в Республике Молдова выявлены растения-резерваторы фитоплазмы Почернение древесины - *Bois noir*;
- впервые в Республике Молдова выявлены цикадки-переносчики фитоплазмы Почернение древесины - *Bois noir*;
- впервые показана роль фактора изменения климата на эффективность распространения фитоплазменного заболевания винограда Почернение древесины в Республике Молдова;
- научно аргументированы предложения по предупреждению распространения заболевания Почернение древесины - *Bois noir* в Республике Молдова.

**Важной научной проблемой, решаемой в области исследований, является:** идентификация возбудителя и растений-резерваторов фитоплазмы, вызывающей у виноградной лозы заболевание фитоплазменной этиологии, а также определение условий способствующие быстрому распространению заболевания на плантациях. Разработка мероприятий, способствующие эффективному предупреждению распространения заболевания на плантациях винограда Республики Молдова.

**Информационная база исследования.** Теоретической основой диссертационной работы послужили исследования зарубежных учёных посвящённые вопросам фитоплазменных заболеваний виноградной лозы и их переносчикам: Angelini E. 2001, 2003, 2004; Bertaccini A. 2010, 2018; Boudon-Padieu E. 2005; Contaldo N. 2012, 2013, 2015, 2016; Dermastia M. 2017; Kosovac A. 2016; Maixner M. 2011; Mannini F. 2009; Marcone C. 2019; Namba S. 2017, 2019; Pierro R. 2018, 2020; Quaglino 2013, 2014, 2019; Timus A. 2013; 2015; Weintraub P. 2010; Богоутдинов Д. 2019; Кастальева Т. Б. 2016. Практическая часть работы выполнена согласно тематическому плану исследований лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля НПИСВиПТ (проект 15.817.05.32А «Tehnologii inovative în viticultură și vinificație-siguranța alimentară a produselor viti-vinicole») и в рамках проекта «FlaveDor» («Flavescence doree / Bois noir - depistare, profilaxie și combatere»), организованного национальным офисом винограда и вина.

**Теоретическое обоснование работы:** эпифитотийное распространение и высокая степень поражения плантаций винограда в Республике Молдова фитоплазменным заболеванием, возможно только при наличии источника заболевания и эффективного переносчика. Поэтому исследования для решения данного вопроса были направлены на идентификацию возбудителя заболевания и его переносчиков, определению резерваторов фитоплазмы и факторов способствующих заражению виноградного растения фитоплазменным заболеванием.

**Практическое значение работы:** состоит в идентификации заболевания виноградной лозы винограда Почернение древесины - *Bois noir* и его возбудителя фитоплазмы *Candidatus phytoplasma solani*, растений-резерваторов фитоплазмы и цикад-переносчиков, а также в предоставлении научно-обоснованных мер по предупреждению распространения данного заболевания на плантациях винограда Республики Молдова.

### **Основные научные результаты, представляемые на защиту, состоят из:**

- установлено заболевание виноградной лозы фитоплазменной этиологии Почернение древесины - *Bois noir*;
- идентифицирован возбудитель заболевания винограда Почернение древесины - *Bois noir* фитоплазма *Candidatus Phytoplasma solani*;
- определены цикадки-переносчики фитоплазмы вызывающие заболевание виноградной лозы Почернение древесины: *Hyalesthes obsoletus* (Signoret), *Anaceratagallia ribauti* (Ossiannilsson) и *Reptalus quinquecostatus* (Dufour);
- выявлены растения-резерваторы заболевания винограда Почернение древесины: *Convolvulus arvensis* L., *Cynanchum acutum* L., *Chenopodium bonus-henricus* L., *Rosa* L., *Ulmus* L.;
- установлена роль фактора изменения климата на эффективность распространения заболевания Почернение древесины на плантациях винограда в Республике Молдова;

**Внедрение научных результатов.** Результаты исследований применяются в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля НПИСВиПТ, в работе по получению клонов винограда свободных от фитоплазменной, вирусной и бактериальной инфекций, фитосанитарному контролю плантаций винограда и виноградной школки, при тестировании посадочного материала, привойной и подвойной лозы на наличие фитоплазменных заболеваний, а так же на семинарах по обучению инспекторов ANSA: «Investigările în teren boli fitoplasmice, pe teritoriu Institutului Științific Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare», (практическая часть) 12 сентября 2018; «Școlarizarea angajaților ANSA privind depistarea simptomelor maladiilor fitoplasmice și evaluarea plantațiilor viticole la prezența *Grapevine flavescence Doree / Bois Noir*», (практическая часть), str. Vierul 59, mun. Chișinău, 24 сентября 2019.

**Апробацию научных результатов.** Диссертация выполнена и обсуждена в рамках комитетов докторской школы партнерства образовательных и исследовательских учреждений в области сельского хозяйства. Результаты были одобрены руководящим комитетом соответствующей докторской школы.

**Публикации по теме диссертаций.** Основные идеи и материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах, из них 7 - в международных научных изданиях: конгресс Международного совета по изучению вирусных и вирусоподобных заболеваний виноградной лозы: «Survey on grapevine yellows and their vectors in the Republic of Moldova» Congress of the International Council for the study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine. Proceedings of the 19th, 9-12 April, Santiago, Chile, 2018; «Почернение Древесины – фитоплазменное заболевание винограда в Республике Молдова», Русский виноград, том 12, 33-40, 2020; «Горячая водная терапия в фитосанитарной селекции винограда», Русский виноград, том 13, 16-24, 2020; «Агротехнический метод предупреждения распространения почернения древесины винограда». Русский виноград. Сборник научных трудов, Том 14. 2020, Новочеркасск; «Распространение почернения древесины винограда в естественных условиях», «74-a conferință științifică a studenților, masteranzilor și doctoranzilor» CE UASM, 15-26 martie 2021, Chișinău; на международном научно-

практическом форуме: «Hyalesthes obsoletus is an active vector of Wood blackening in the Republic of Moldova», «Biologization of the Intensification Processes In Horticulture and Viticulture», 21-23 September 2021, North Caucasian Federal Scientific Centre of Horticulture, Viticulture, Winemaking, Russia, Krasnodar; «Выявление фитоплазмы Candidatus Phytoplasma Solani на плантациях винограда в Республике Молдова», «Sectorul Agroalimentar - Realizări și Perspective» Simpozion Științific Internațional, 19-20 noiembrie 2021, Chișinău; в профильных журналах из Национального реестра 2: Фитоплазмоз виноградной лозы в Молдове, Agroexpert, стр. 84-92, №1 Март 2020; Цикадки переносчики фитоплазменного заболевания почернение древесины (Bois Noir) в Республике Молдова. Agricultural science, 2023, (1), 66–74.

**Объём и структура диссертации** определялись целью и задачами работы и включают: аннотации на румынском, английском и русском языках, введение, 3 главы, общие выводы и практические рекомендации, библиография (243 библиографических источников). Содержание диссертации изложено на 112 страницах основного текста. Работа содержит 35 рисунков, 22 таблицы, 20 приложений.

**Ключевые слова:** фитоплазма, Почернение древесины, Золотистое пожелтение, виноград, симптомы фитоплазменного заболевания, мониторинг, цикадки-переносчики, растение-резерватор фитоплазмы, ПЦР.

## **СОДЕРЖАНИЕ**

Введение включает важность и актуальность темы диссертации, цель и задачи исследования, методологию научных исследований, научную новизну результатов, решённую важную научную задачу, описание теоретической и практической значимости работы, апробации результатов и выводы по каждой главе.

### **I. АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ИЗУЧЕННОСТИ ФИТОПЛАЗМЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Представлен анализ состояния изученности фитоплазменных заболеваний, изложен анализ научных трудов, а также синтез накопленных знаний по фитоплазменным заболеваниям. Особое внимание уделено биологическим характеристикам возбудителей фитоплазменных заболеваний, симптомам проявления на виноградной лозе, а также их переносчикам. Анализированы методы идентификации фитоплазменных заболеваний винограда. Освещены мероприятия по предупреждению распространения фитоплазмозов и методы борьбы с переносчиками.

### **II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Материалом для исследований служили плантации винограда во всех районах промышленного возделывания данной культуры в Республике Молдова. Определение поражения плантаций винограда заболеванием фитоплазменной этиологии осуществляли методом визуального осмотра кустов при экспедиционных обследованиях. Плантации обследовали блоками по 10 рядов в каждой клетке по диагонали виноградника. В учётных рядах учитывали количество поражённых кустов и выпады. Степень поражения плантаций рассчитывали исходя из количества кустов с симптомами заболевания и общего фактического количества кустов в

обследованных рядах. Мониторинг цикадок проводили посредством отлова насекомых на виноградных плантациях и прилегающих территориях. Отлавливали насекомых с апреля по сентябрь месяц с помощью энтомологического сачка и липких ловушек жёлтого цвета. Ловушки меняли каждые 10-15 дней. Консервацию отловленных цикадок проводили замораживанием при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ . Идентификацию цикадок проводили по определителю Ануфриев Г.А., Емельянов А.Ф 1988 и Wilson M. R. & Turner, J. A. 2010 [19; 21].

Исследования по идентификации заболевания и установлению его возбудителя проводили в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля, научно-практического института садоводства виноградарства и пищевых технологий, тестированием проб виноградных, сорных, кустарниковых и древесных растений, методом ПЦР. Проба для тестирования состояла из 20 листьев с симптомами заболевания, без поражения другими патогенами, без некрозов и внешних повреждений. Отобранные листья пробы помещали в герметичный пластиковый пакет с маркировкой. Куст, с которого отобрана проба, отмечали яркой клейкой лентой. Пробы доставляли в лабораторию в течение 24-48 часов после отбора, (хранение при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ ). В случае отбора проб лозы, секатором нарезали 5 черенков длиной 10-12 см. Выделение ДНК фитоплазмы-возбудителя заболевания из проб виноградной лозы, для проведения ПЦР анализа, проводили по методу Angelini et al., 2001 [2]. Выделение ДНК фитоплазмы-возбудителя заболевания из проб насекомых проводили согласно рекомендациям Научно-исследовательского центра виноградарства (CREA) Конеглиано, Италия. Диагностику заболевания выполняли французским официальным методом Вложенной ПЦР (Duplex Nested End - Point PCR – с англ.), коммерческим набором от Qualiplante (Flavescence dorée / Bois noir – с франц.) [12], для первой амплификации применяли праймеры: FD9f1 / FD9r1 и STOL11f2 / STOL11r1, для второй амплификации: FD9r2 / FD9f3b и STOL11f3 / STOL11r2. Визуализация результатов ПЦР проведена при электрофоретическом разделении молекул ДНК по размеру, в 1% агарозном геле, с добавлением флуоресцирующего красителя. Визуализацию продукта ПЦР проводили в трансиллюминаторе, при ультрафиолетовом свете. Идентификацию фитоплазмы, возбудителя заболевания, проводили методом секвенирования ДНК. ДНК для секвенирования получали очисткой ПЦР продукта применяя набор SiMax™. Работа по секвенированию выполнена в научно-производственной компании «СИНТОЛ» (г. Москва, Россия). Метеорологические данные получены с помощью агрометеостанций расположенных на промышленных плантациях винограда.

## **III. ЗАБОЛЕВАНИЕ ФИТОПЛАЗМЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ПЛАНТАЦИЯХ ВИНОГРАДА РЕСПУБЛИКИ МОЛДОВА.**

### **3.1. Симптомы заболевания фитоплазменной этиологии на кустах винограда**

**Симптомы на листьях.** В климатических условиях Республики Молдова первые симптомы заболевания проявляются в начале июля. У белых сортов винограда на листьях одного или нескольких побегов на кусте появляется слабый хлороз. С развитием болезни листья приобретают золотисто-желтую с металлическим блеском



окраску, становятся твёрдыми на ощупь и скручиваются краями вниз. Вдоль главных жилок появляются хромово-желтые пятна, которые впоследствии некротизируют. К концу вегетационного периода листья скручиваются до такой степени, что приобретают треугольную форму. Больные листья висят, несколько напоминают расположение черепицы на крыше (Рис. 1).



**Рисунок 1. Симптомы фитоплазменного поражения листьев на белых сортах винограда: слева - поражённые листья треугольной формы со скрученными краями вниз; справа - некроз участков листовой пластинки**

У сортов с красными ягодами вместо пожелтения происходит покраснение листовых пластинок, причем покраснения часто занимают только один сектор, ограниченный двумя или тремя жилками (Рис. 2).



**Рисунок 2. Симптомы фитоплазменного заболевания на листьях красных сортов винограда**

Поражённые фитоплазмозом листья, в отличие от здоровых, более обезвожены, вследствие чего выдерживают первые легкие заморозки, не теряют форму и цвет, поэтому поздно осенью больные кусты видны издалека (Рис. 3).



**Рисунок 3. Симптомные листья остаются на поражённом фитоплазмозом кусте после первых лёгких заморозков**

**Симптомы на лозе.** Больные побеги отличаются короткими междуузлиями, подавленным ростом. Из-за плохой лигнификации поражённые побеги часто изгибаются к почве, вследствие чего сильно пораженные кусты имеют «плачущий вид» (Рис. 4).



**Рисунок 4. Плохая лигнификации побегов на кустах винограда поражённых фитоплазмозом**

На поверхности больных побегов появляются многочисленные пустулы. К осени поражённые побеги не созревают или же созревают только у основания в районе 2-х, 3-х глазков (Рис. 5, 6).



**Рисунок 5. Симптомы фитоплазмоза на виноградной лозе: слева - пустулы чёрного цвета на поверхности поражённых побегов; справа - поражённая лоза не вызревает**



**Рисунок 6. Созревание лозы, на поражённом фитоплазмозом кусте, происходит только у основания побегов**

К концу вегетационного периода, не вызревшая лоза, часто приобретает чёрный цвет (Рис. 7). С наступлением низких температур такая лоза погибает.

**Симптомы на гроздях.** Характерной особенностью фитоплазменного заболевания, является поражение у инфицированных растений генеративных органов. У виноградной лозы фитоплазма вызывает стерильность и осыпание соцветий, вследствие чего поражённые в сильной степени побеги, как правило остаются без урожая. Если заражение лозы произошло в более позднее время, то завязавшиеся ягоды и грозди, вследствие прогрессирования заболевания, становятся некондиционными, обезвоженными и не приятными на вкус (Рис.7).



**Рисунок 7. Симптомы фитоплазменного заболевания на гроздях, листьях и лозе**

Симптомы заболевания наблюдали практически на всех сортах винограда, возделываемых в Молдове. Однако интенсивность их проявления на кустах, типичность и процент поражения варьировал.

### **3.2. Поражение плантаций винограда заболеванием фитоплазменной этиологии**

Определение масштабов распространения и степени поражения насаждений винограда, фитоплазменным заболеванием, устанавливали методом маршрутных обследований. Всего в период с 2017 по 2020 год проведены визуальные обследования плантаций винограда общей площадью 1438 га. Результаты обследований представлены в таблице 1.

Приведённые в таблице 1 данные свидетельствуют о том, что все обследованные плантации винограда поражены фитоплазменным заболеванием. Так самыми поражёнными фитоплазменным заболеванием в РМ являются плантации винограда сорта Шардоне, степень поражения которых колеблется от 25,8% до 100,00%. Следующими по степени поражения являются плантации сорта Рислинг рейнского инфицированные на 37,9% - 100% и плантации сорта Совиньон-блан от 3,9 до 99,2% соответственно. Плантации винограда красных сортов так же инфицированы фитоплазменным заболеванием. Наиболее поражёнными заболеванием являются плантации сорта Пино нуар, заражённость которых варьирует от 3,8% до 98,55%. Насаждения винограда сорта Мерло инфицированы в пределах 15,2 - 73,80%, Каберне-Совиньон 12,7 - 39,28% соответственно. Заболевание фитоплазменной этиологии установлено и на плантациях автохтонных сортов винограда. Так, поражение фитоплазмозом насаждений сорта Фетяска нягрэ варьирует от 0,9 до 29,70%, а Пара нягрэ от 1,3 до 70% соответственно.

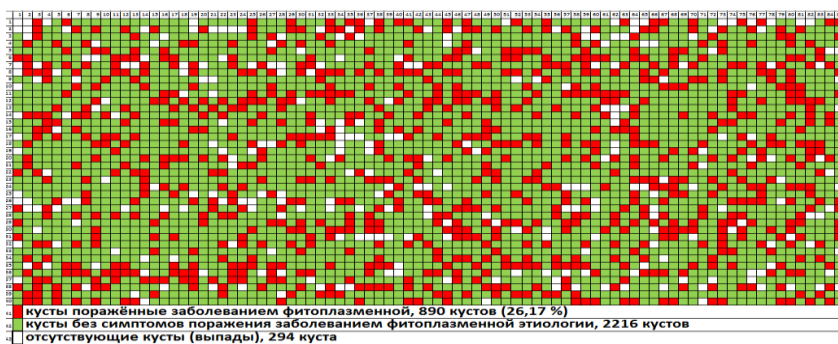
**Таблица 1. Поражение плантаций винограда заболеванием фитоплазменной этиологии (2018 – 2020 гг.)**

№	Админ. район, населённый пункт	Сорт	Площадь, га	Заражён. %
1	Бессарабский р-н, г. Бессарабка	Мускат Оттонель	7,4	85,00
		Шардоне	6,8	100,0
		Рара нягрэ	3,8	70,0
2	Кагульский р-н, с. А.И. Куза	Шардоне	32,93	60,07
		Фетяска нягрэ	12,00	24,80
3	Каушанский р-н, с. Тараклия	Совиньон-блан	38,52	28,43
		Рислинг рейнский	13,45	37,9
		Мускат Оттонель	8,13	45,50
		Мерло	3,3	15,2
		Каберне-совиньон	3,3	12,7
4	Каларашский р-н, с. Пзулешть	Совиньон-блан	38,5	81,30
5	АТО Гагаузия, с. Буджак	Рара нягрэ	2,2	29,50
6	Новоаненский р-н, с. Мерены	Каберне-совиньон	5,23	35,17
		Фетяска нягрэ	12,00	29,70
		Мерло	23,72	73,80
7	Новоаненский р-н, с. Крецоя	Пино-нуар	3,0	3,8
		Каберне-совиньон	9,2	39,28
8	Новоаненский р-н, с. Мими	Пино-нуар	6,5	98,55
9	Ниспоренский р-н, с. Варзарешть	Фетяска нягрэ	1,22	7,30
10	Страшенский р-н, с. Ромэнешть	Шардоне	12,0	83,90
9	Страшенский р-н, с. Кодрянка	Шардоне	15,3	25,8
11	Теленештский р-н, с. Теленешть	Рислинг рейнский	6,78	68,70
		Шардоне	23,08	80,20
		Совиньон-блан	5,8	53,20
12	Леовский р-н, с. Сэрата Ноуэ	Шардоне	30,0	96,21
		Совиньон-блан	30,0	70,30
13	Леовский р-н, г. Леова	Каберне-совиньон	30,0	19,15
14	Леовский р-н, с. Томай	Рислинг рейнский	24,0	97,80
		Шардоне	5,0	98,12
15	Кантемирский р-н, с. Плешены	Совиньон-блан	32,0	99,2
16	Штефан-Водский р-н, с. Пуркары	Шардоне	19,35	81,90
		Совиньон-блан	19,14	3,9
		Фетяска нягрэ	5,17	28,00
		Саперави	10,40	22,20
		Рара нягрэ	4,25	36,10
17	АТО Гагаузия, с. Томай	Мерло	11,31	43,30
		Каберне-совиньон	19,0	26,10
		Рара нягрэ	4,25	28,60
18	Криулянский р-н, с. Слободзея-Душка	Пино-нуар	6,0	43,47
19	Унгенский р-н, с. Мирчешть	Рара нягрэ	1	1,3
		Фетяска нягрэ	1	0,9

Анализ приведенных в таблице 1 данных говорит о широком распространении и высокой степени поражения плантаций винограда в Республике Молдова фитоплазменным заболеванием, которое представляет серьёзную опасность виноградарству как в снижении количества и ухудшении качества урожая, так и в сокращении долговечности виноградных кустов.

### 3.3. Расположение поражённых заболеванием фитоплазменной этиологии кустов винограда на плантациях

Широкое распространение заболеваний винограда фитоплазменной этиологии и высокая степень поражения ими плантаций обуславливают необходимость изучения процесса распространения инфекции. Для решения данной задачи в 2017 году были отобраны плантации для проведения исследований по изучению распространения заболевания в естественных условиях, в трёх зонах возделывания винограда: южной - с. Буджак, АТО Гагаузия; юго-восточной - с. Тэнэтарь, Каушанский р-н; центральной - с. Слободзея-Душка, Криулянский р-н. На данных плантациях выделены опытные делянки от 2,5 до 6 га, общей площадью 29 га. Делянки для исследований отбирали в середине плантаций, с целью исключения влияния граничащих с плантациями экосистем. В сентябре 2017 года, в период чёткого проявления симптомов заболевания [27], проведено обследование всех опытных делянок на предмет поражения заболеванием фитоплазменной этиологии. Учёты проводили по каждому ряду опытных делянок. Визуальному осмотру подлежали все кусты, растущие на опытной делянке. Результаты учётов вносили в инвентаризационные листы, в которых отмечали здоровые кусты и кусты, проявляющие симптомы фитоплазменного заболевания, а также отсутствующие кусты (выпады). Таким образом, каждый куст, растущий на опытной делянке имел следующие координаты: плантация, клетка, ряд, пролёт и номер куста. После обработки данных инвентаризационных листов компьютерной программой Microsoft Office Excel, были получены карты-схемы всех опытных делянок. На карте-схеме каждый поражённый заболеванием куст отмечен красным цветом. Таким образом, карта схема позволяет визуально увидеть расположение поражённых заболеванием кустов на плантации. Пример такой карты-схемы, делянки площадью 1 га, выделенной на плантации сорта Каберне-совиньон с. Тэнэтарь, Каушанский р-н, представлен на рисунке 8.



**Рисунок 8. Карта-схема расположения поражённых фитоплазменным заболеванием кустов винограда сорта Каберне-совиньон**

На представленной карте-схеме (Рис. 8) не наблюдается больших очагов, поражённых заболеванием кустов или инвазии заболевания, с какой-либо стороны.

Поражённые заболеванием кусты в ряду виноградника чередуются с кустами безсимптомов. В то же время часто встречается поражение 3-4-х кустов подряд. Группы поражённых заболеванием кустов соседствуют с такими же группами двух соседних рядов. Поражённые кусты равномерно расположены на плантации. Такое расположение поражённых кустов свидетельствует о том, что источник фитоплазмовозбудителя болезни и её переносчик, так же равномерно распределены на плантации винограда. Заболевания фитоплазменной этиологии не передаются посредством контакта корней, побегов, листьев или других органов растения, поэтому высокий процент поражения плантаций винограда свидетельствует о наличии в Республике Молдова активных переносчиков фитоплазмы.

### 3.4. Идентификация заболевания винограда фитоплазменной этиологии

Известны два широко распространенных заболевания фитоплазменной этиологии, поражающие виноградное растение: Золотистое пожелтение - *Flavescence doree* и Почернение древесины - *Bois noir*. Данные заболевания проявляют на виноградном растении идентичные симптомы, но отличаются фитоплазмой возбудителем и цикадками-переносчиками. Поэтому на следующем этапе исследований была проведена идентификация заболевания. Для этой цели, со всех обследованных плантаций винограда и виноградных школок были отобраны пробы листьев с симптомами заболевания. Осенью, после опадения листьев, были собраны пробы вызревшей однолетней лозы. Все пробы были тестированы методом ПЦР на наличие фитоплазмы Почернения древесины (BN) и фитоплазмы Золотистого пожелтения (FD) (Рис. 9). Диагностику проводили в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля.

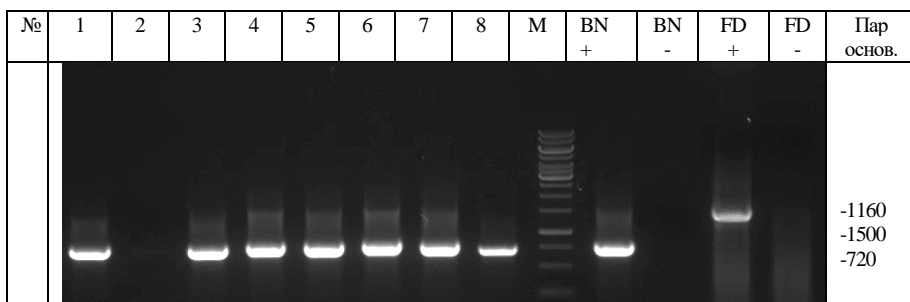


Рисунок 9. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами FD9r2 / FD9f3b и STOL11f3 / STOL11r2

На рисунке 9 представлен результат тестирования 8 проб виноградной лозы, которые находятся под номерами от 1 по 8. Маркер (M) - ДНК известной длины от 200 до 10000 пар оснований. Электрофорез в геле 1% раствора агарозы демонстрирует чёткое детектирование ампликонов проб № 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 на уровне положительного контроля (BN+), размером 720 пар оснований, что означает наличие в пробах фитоплазмы Почернения древесины. В пробе №2 не детектирована амплифицированная ДНК, что говорит об отсутствии фитоплазмы BN, равно как и

фитоплазмы *FD*. В отрицательных контролях нет амплифицированной ДНК, что свидетельствует об отсутствии контаминаций. Результаты ПЦР тестирования проб виноградной лозы на наличие фитоплазмы возбудителя заболевания представлены в таблице 2.

**Таблица 2. ПЦР-тест проб собранных при обследовании плантаций винограда РМ на наличие фитоплазменных заболеваний *FD*/*BN* (2018-2019 гг.)**

№	Пробы	Тестировано проб		
		всего	инфицированы	Диагностировано заболевание <i>FD/BN</i>
1	Листья из плантации винограда	297	192	Почернение древесины - BN
2	Лоза из плантации винограда	26	10	Почернение древесины - BN
3	Листья из виноградных школок	23	13	Почернение древесины - BN
итого		346	215	

Как видно из таблицы 2, всего тестировано 346 проб, из которых 215 (62,1%) проб дали положительную реакцию на фитоплазму-возбудителя заболевания виноградной лозы *BN*. Тестирование проб листьев с симптомами фитоплазменного заболевания из виноградных школок показало наличие в них фитоплазмы - возбудителя Почернения древесины. Фитоплазма возбудитель *BN* диагностирована в пробах вызревшей лозы, собранной от кустов с симптомами заболевания фитоплазменной этиологии. Ни одна из тестированных проб не содержала фитоплазмы, вызывающей у винограда заболевание Золотистое пожелтение - *FD* [26; 28]. Результаты тестирования позволяют сделать заключение, что заболевание фитоплазменной этиологии поражающее виноградную лозу во всех районах её возделывания, в Республике Молдова, является Почернение древесины - *Bois noir*. Положительные результаты тестирования проб из виноградных школок, свидетельствуют о риске выращивания посадочного материала, инфицированного *BN*. Использование изначально больных саженцев, при посадке плантаций винограда, может способствовать появлению новых очагов заболевания. Диагностика фитоплазмы Почернение древесины в вызревшей виноградной лозе свидетельствует о возможности использования ПЦР теста для фитосанитарного контроля материала для размножения и посадочного материала винограда.

### **3.5. Выявление цикад переносчиков фитоплазмы возбудителя заболевания винограда Почернение древесины - *Bois noir* в Республике Молдова**

Цикадки-переносчики фитоплазмы Почернения древесины являются полифагами, поэтому отлов насекомых проводили как с кустов винограда, так и с сорных растений, растущих на плантации. Отлов цикадок с виноградных кустов проводили с помощью липких ловушек желтого цвета, а с травянистых растений при помощи ловчего энтомологического сачка. Для выявления общеизвестных и потенциальных насекомых-переносчиков проводили мониторинг плантаций винограда с мая по сентябрь месяц. В период с 2017 по 2020 год, на плантациях Каушанского и Яловенского районов было отловлено 1733 экземпляра цикадок. Видовой состав отловленных насекомых, начало и продолжительность лёта, а также



результаты тестирования на наличие фитоплазмы Почернение древесины представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, на плантациях винограда в Республике Молдова, присутствует 15 видов цикадок. Наибольшую популяцию представляют цикадки *Psammotettix alienus*. Насекомые отловлены на плантациях винограда и прилегающих к ним территориях. Многие представители цикадок относящиеся к роду *Psammotettix* способны приобретать фитоплазму. Так цикадка *P. striatus* является переносчиком заболевания Карликовости пшеницы в Китае [1; 18; 20], а цикадка *P. cephalothes* фитоплазмоза риса (штамм BVK) в Азии [9]. Следующая по численности популяция цикадки *Arboridia ribauti* - насекомое распространено на всех виноградных плантациях. Популяция цикадки *Hyalesthes obsoletus* (Рис. 10) меньше по численности, в то же время наблюдали насекомых повсеместно, как на плантациях винограда, так и на сорных растениях, растущих на прилегающих к ним территориях. Предпочтительным растением цикадки является Вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis* L.). На данном растении были отловлены нимфы и личинки 5-ой возрастной стадии цикадки *H. obsoletus* (Рис. 11, 12), что позволяет сделать заключение, о том, что Вьюнок полевой является растением хозяином насекомого. В условиях Республики Молдова лёт имаго начинается с июня, а массовый лёт в первой половине июля месяца [8]. В период массового лёта, цикадки *Hyalesthes obsoletus* встречались на Дурнишнике обыкновенном (*Xanthium strumarium* L.) и Цинанхум острый (*Cynanchum acutum* L.), а также на Повое заборном (*Calystegia sepium* L.), Лебеде садовой (*Ariplex hortensis* L.), Осоте огородном (*Sonchus oleraceus* L.), Одуванчике лекарственном (*Taraxacum officinale* L.) и Крапиве двудомной (*Urtica dioica* L.). Цикадка *Austroagallia torrida*, была отловлена на сорных растениях, произрастающих на прилегающей к плантации винограда территории. В Австралии данное насекомое является переносчиком вируса Курчавости листьев клевера [7]. Цикадка *Philaenus spumarius* - встречалась с конца мая по июль месяц на сорной растительности виноградников. Известны случаи диагностирования фитоплазмы в цикадке *P. spumarius* [10]. Цикадки *Euscelis variegatus* также обитают на сорных растениях плантаций винограда. Представители рода *Euscelis* являются переносчиками фитоплазменных заболеваний растений. Так цикадки *E. incisus* (*Kirschbaum*) способны приобретать и передавать фитоплазму Пожелтения хризантем (16SrI-B) [15], а *Euscelidius variegatus* (*Kirschbaum*) - являются переносчиками Золотистого пожелтения винограда во Франции (16SrV-C) [4]. Цикадка *Javesella pellucida* была отловлена на сорных растениях плантаций винограда. Лёт насекомого наблюдали с апреля по сентябрь. Цикадки *J. pellucida* являются переносчиками фитоплазменного заболевания моркови [6]. В Чешской Республике цикадка встречалась на кустах винограда, инфицированных Почернением древесины, в то же время в насекомом диагностировали наличие фитоплазмы принадлежащей к группе Пожелтения Астр 16SrI-F [11]. Цикадка *Neoaliturus fenestratus* на насаждениях винограда встречалась довольно редко. В Иране, данное насекомое, является переносчиком филлодии злаковых [14; 5]. Цикадки *Scaphoideus titanus* отлавливали на плантациях винограда с помощью липких ловушек жёлтого цвета. Лёт имаго начинался с июля и продолжался

до конца сентября, что согласуется с ранее проведёнными исследованиями в условиях Республики Молдова [16; 17].

Отловленные на плантациях винограда цикадки *Psammotettix alienus*, *Hyalesthes obsoletus*, *Austroagallia torrida*, *Philaenus spumarius*, *Euscelis variegatus*, *Javesella pellucida*, *Nealiturus fenestratus* и *Scaphoideus titanus* являются переносчиками фитоплазм, которые вызывают различные заболевания у растений.

Способность данных насекомых переносить фитоплазму Почернения древесины винограда проверяли методом тестирования проб, приготовленных из каждого вида цикад, на наличие возбудителя заболевания. Количество проб, каждого вида цикадок и результаты ПЦР тестов представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Видовой состав цикадок на плантациях винограда в Республике Молдова и их отношение к фитоплазме Почернение древесины (2018 – 2020 гг.)**

№	Цикадки	Отловлено особей (шт.)	Начало лета - конец лета			Тестировано проб	
			2018-2020	2018	2019	2020	всего
1	<i>Adarrus multinotatus</i> (Boheman, 1847)	11	28.V-15.VI	5.VI-14.VI	3.VI-26.VI	-	-
2	<i>Anaceratagallia ribauti</i> (Ossiannilsson, 1938)	8	11.VII	24.VI-17.VII	06.VIII	5	1
3	<i>Arboridia ribauti</i> (Ossiannilsson, 1937)	599	2.V-1.X	19.IV-13.IX	18.V-16.IX	-	-
4	<i>Austroagallia torrida</i> (Ossiannilsson, 1937)	8	14.VII	17.VII	06.VIII	-	-
5	<i>Dictyophara europaea</i> (Linnaeus, 1767)	6	-	15.VII	24.VI-17.VII	-	-
6	<i>Empoasca vitis</i> (Gothe, 1875)	19	31.V-8.VIII	29.V-15.VII	3.VI-15.IX	-	-
7	<i>Euscelidius variegatus</i> (Kirschbaum, 1858)	33	7.V-18.VIII	19.IV-17.VIII	06.VIII-15.IX	5	0
8	<i>Fieberiella florii</i> (Stal, 1864)	24	10.V-24.IX	25.VI	3.VI	-	-
9	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (Signoret, 1865)	106	12.VI-23.VIII	24.VI-20.VIII	15.VI-13.VIII	25	10
10	<i>Javesella pellucida</i> (Fabricius, 1794)	17	-	19.IV-13.IX	29.VI-04.VIII	6	0
11	<i>Nealiturus fenestratus</i> (Herrich-Schaffer, 1834)	18	12.VI-19.VIII	9.VII	26.VI-04.VIII	6	0
12	<i>Philaenus spumarius</i> (Linnaeus, 1758)	49	4.V-27.VI	29.V-17.VII	11.VI-21.VII	10	0
13	<i>Psammotettix alienus</i> (Dahlbom, 1850)	692	31.V-27.VII	19.IV-13.IX	3.VI-04.VIII	8	0
14	<i>Reptalus quinquecostatus</i> (Dufour, 1833)	7	13.VI	15.VII	20.VIII-15.IX	4	1
15	<i>Scaphoideus titanus</i> (Ball, 1932)	67	9.VII-13.IX	9.VII-2.IX	3.VII-9.IX	15	0
итого		1733				77	12

Положительные результаты на наличие фитоплазмы Почернение древесины показали пробы трёх видов цикад: *Anaceratagallia ribauti*, *Hyalesthes obsoletus* и *Reptalus*

*quinquecostatus* [8, 29]. Амплификации с праймерами для детекции фитоплазменных заболеваний, относящихся к группе столбура (*STOL11f2* / *STOL11r1*), уже на первом этапе Вложенной ПЦР получили ампликоны из проб с цикадками *H. obsoletus* и *R. quinquecostatus*. Положительные результаты подтвердились и во втором цикле амплификации с парой внутренних праймеров (*STOL11f3* / *STOL11r2*), что означает наличие фитоплазмы Почернения древесины винограда в данных цикадках.



**Рисунок 10.** Цикадки *Hyalesthes obsoletus*: слева имаго женского пола; справа имаго мужского пола



**Рисунок 11.** Нимфа *Hyalesthes obsoletus* III-ей возрастной стадии



**Рисунок 12.** Личинки *Hyalesthes obsoletus* V-ой возрастной стадии

Наличие фитоплазмы Почернения древесины в цикадках *Hyalesthes obsoletus*, *Anaceratagallia ribauti* и *Reptalus quinquecostatus* позволяет сделать заключение о том, что данные насекомые являются переносчиками фитоплазмы возбудителя заболевания. Установление наличия фитоплазмы Почернения древесины в цикадке *A. ribauti* согласуется с результатами работ по передаче заболевания, данной цикадкой, австрийских исследователей [13].

Тестированием цикадок *H. obsoletus* установлено, что 40% из них содержали фитоплазму Почернения древесины. Большой процент вироформных насекомых объясняется высокой степенью инфицирования растений- хозяев цикадки.

### **3.6. Выявление растений-резерваторов фитоплазмы Почернения древесины винограда**

Необходимым условием в распространении фитоплазмы Почернения древесины винограда является наличие на плантации растений резерваторов заболевания и цикадок переносчиков. Количество инфицированных фитоплазмой

цикад на плантации зависит от преобладания растений-хозяев. Выявление растений резерваторов фитоплазмы Почернения древесины винограда проводили тестированием методом ПЦР проб сорных, кустарниковых и древесных растений на наличие возбудителя заболевания. Пробы для тестов отбирали в период обследований плантаций винограда на поражение заболеванием фитоплазменной этиологии. Для тестирования собирали растения, проявляющие подавленность роста и развития, нарушение пигментации и деформации листовых пластинок. Всего для диагностики отобрали 34 пробы с явными симптомами поражения. Видовой состав проб, их количество и результаты тестирования на наличие фитоплазмы Почернения древесины представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Результаты ПЦР диагностики образцов травянистых, кустарниковых и древесных растений на наличие фитоплазмы BN**

№	Виды	Пробы	
		тестируемые, шт.	инфицированные BN, шт.
1	<i>Convolvulus arvensis</i> L. - вьюнок полевой	8	5
2	<i>Synanchum acutum</i> L. - цинанхум острый	5	3
3	<i>Ulmus</i> L. - вяз	2	2
4	<i>Rosa</i> L. - роза	1	1
5	<i>Sonchus arvensis</i> L. - осот полевой	3	0
6	<i>Chenopodium bonus-henricus</i> L. - марь цельнолистная	1	1
7	<i>Linaria vulgaris</i> L. - льяника обыкновенная	2	0
8	<i>Viscum album</i> L. - омела белая	2	0
9	<i>Xanthium strumarium</i> L. - дурнишник обыкновенный	3	0
10	<i>Aristolochia</i> L. - кирказон	2	0
11	<i>Datura stramonium</i> L. - дурман обыкновенный	1	0
12	<i>Atriplex hortensis</i> L. - лебеда садовая	2	0
13	<i>Acacia</i> L. - акация	2	0

Как видно из таблицы 4, ряд тестируемых видов растений показал высокую степень инфицирования фитоплазмой Почернение древесины винограда. Так из 8 тестируемых проб Вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis*) 5 (62,5%) проб показали наличие фитоплазмы Почернение древесины.

Аналогичные результаты получены при тестировании Цинанхума острого (*Synanchum acutum* L.): из 5 тестируемых 3 пробы (60%) содержали фитоплазму Почернение древесины винограда.

Пробы таких растений, как Вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis* L.), Цинанхум острый (*Synanchum acutum* L.), Марь цельнолистная (*Chenopodium bonus-henricus* L.), Роза (*Rosa* L.) и Вяз (*Ulmus* L.), собранные на плантациях винограда, показали наличие фитоплазмы Почернение древесины. Тестирование проб, широко распространённых сорных растений на плантациях винограда, показало отсутствие фитоплазмы Почернения древесины, к ним относятся виды: Осот полевой, Дурнишник обыкновенный, Лебеда садовая, Дурман обыкновенный. Аналогичный

результат получен при тестировании проб Акации (*Acacia* L.) и Омелы белой (*Viscum album* L.), часто встречающихся в лесополосах и прилегающих территориях.

Наличие фитоплазмы Почернение древесины винограда в травянистых сорных растениях: Вьюнке полевом, Цинанхум остром и Мари цельнолистной, позволяет отнести их к растениям-резерваторам [26]. Присутствие данных растений, источников инфекции на плантациях, является одной из причин широкого распространения заболевания Почернение древесины винограда в Республике Молдова.

### **3.7. Идентификация фитоплазмы-возбудителя Почернения древесины**

Проведёнными исследованиями установлено, что плантации винограда в Республике Молдова в сильной степени инфицированы фитоплазмой вызывающей на виноградной лозе заболевание Почернение древесины. Данная фитоплазма диагностирована у трёх видов цикадок обитающих на плантациях винограда: *Anaceratagallia ribauti*, *Hyalesthes obsoletus* и *Reptalus quinquecostatus*. Фитоплазма вызывающая заболевание Почернение древесины винограда диагностирована так же и у ряда травянистых, кустарниковых и древесных растений: Вьюнка полевого (*Convolvulus arvensis* L.), Цинанхуме остром (*Cynanchum acutum* L.), Мари цельнолистной (*Chenopodium bonus-henricus* L.), Розе (*Rosa* L.) и Вязе (*Ulmus* L.). В свете вышеизложенного, очень важно идентифицировать фитоплазму-возбудителя заболевания Почернение древесины винограда в РМ. Идентификацию проводили путем сравнения нуклеотидных последовательностей в текстовом виде, полученных секвенированием ДНК фитоплазмы, с нуклеотидными последовательностями ДНК генетической базы NCBI (National Center for Biotechnology Information) [25].

Секвенировали ДНК фитоплазмы Почернения древесины, выделенные из проб листьев винограда сорта Алиготе и Рара нягрэ, травянистого растения - Цинанхум острый и цикадки *H. obsoletus*, давших положительные результаты на данное заболевание при тестировании методом ПЦР. Фрагменты ДНК вырезали из геля агарозы и с помощью набора SiMax™ очистили от остатков геля, ДНК полимеразы, дезоксинуклеотидов и солей. Метод основан на связывании ДНК в буфере с высоким содержанием солей с мембраной из силикагеля в спин-колонке. Для секвенирования искомой матрицы размером 720 пар оснований, концентрацию образцов доводили до рекомендуемой 20 - 22,5 нг. Работа по секвенированию выполнена в научно-производственной компании «СИНОЛ». Полученные нуклеотидные последовательности ДНК фитоплазмы Почернения древесины винограда в текстовом виде сравнили с нуклеотидными последовательностями биообразцов из генетической базы NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), в результате чего установлено, что фитоплазма вызывающая Почернение древесины винограда в РМ, относится к *Candidatus phytoplasma solani*. Проценты прочтения находились на уровне от 87 до 99, а проценты идентификации от 87 до 98%, что говорит о достаточно высокой точности идентификации фитоплазмы.

Полученные результаты секвенирования согласуются с ранее проведённой работой, где совместно с сотрудниками лаборатории CREA (Конельяно, Италия) была проведена диагностика проб виноградных листьев из Молдовы. ПДРФ-анализ

ампликонов показал, что образцы относятся к *Ca. P. solani*, возбудитель Почернения древесины. Данные были подтверждены методом TaqMan ПЦР в реальном времени [3].

### 3.8. Распространение заболевания Почернение древесины на плантациях винограда в Республике Молдова

Проведёнными исследованиями на плантациях винограда в Республике Молдова идентифицировано заболевание фитоплазменной этиологии Почернение древесины, выявлены цикадки-переносчики и растения-резерваты фитоплазмы возбудителя заболевания. Наличие на насаждениях винограда источников заболевания и его переносчиков объясняет широкое распространение и высокую степень поражения Почернением древесины. Для разработки мероприятий по предупреждению распространения заболевания очень важно установить, как в естественных условиях происходит инфицирование растений винограда, и какие факторы способствуют распространению заболевания на плантации. Для решения данного вопроса в 2018 году были продолжены визуальные обследования опытных участков в: с. Буджак, АТО Гагаузия; с. Тэнэтарь, Каушанского р-на; с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на. Обследования проводили ежегодно по 2020 г. включительно. Визуальному осмотру подлежали все кусты, растущие на опытных делянках. Результаты учетов представлены в таблице 5.

**Таблица 5. Динамика распространения заболевания Почернение древесины на плантациях винограда в Республике Молдова (2017-2020 гг.)**

Месторасположение участков	Сорт	Площадь	Инфицированы Почернением древесины, %			
			2017 г.	2018 г.	2019 г.	2020 г.
с. Буджак, АТО Гагаузия	Фетяска нягрэ	2,5	6,91	7,97	11,70	16,0
	Рара нягрэ	2,5	14,81	17,28	29,50	14,9
с. Слобозия-Душка, Криулянский р-н	Каберне-совиньон	4,0	9,66	16,16	18,80	12,4
	Пино-нуар	6,0	11,54	48,37	43,30	15,8
с. Тэнэтарь, Каушанский р-н	Каберне-совиньон	3,3	19,55	26,17	12,70	9,4
	Пино-нуар	3,3	16,21	14,05	7,07	3,4
	Мерло	3,3	46,48	10,78	10,20	3,6

Как видно из таблицы 5, обследованные в течение 2017 - 2019 гг. участки винограда демонстрируют рост количества поражённых Почернением древесины кустов на одних и уменьшение на других. Так, количество поражённых кустов на участках в с. Буджак значительно увеличилось: у сорта Фетяска нягрэ количество поражённых в 2017 г. составляло 6,91%, а в 2019 г. - 11,70%, у сорта Рара нягрэ 14,81% в 2017 г. и 29,50% в 2019 г. соответственно. Рост количества поражённых кустов наблюдается и на участках с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на: количество поражённых кустов сорта Каберне-совиньон в 2017 г. составляло 9,66%, а в 2019 - 18,80%, у сорта Пино-нуар 11,54% в 2017 г. и 43,30% в 2019 г. соответственно. На участке с. Тэнэтарь, Каушанского р-на наблюдается постепенное снижение

количества поражённых фитоплазмозом кустов, так поражение сорта Каберне-совиньон в 2017 г. составило 19,55%, а в 2019 - 12,70%, у сорта Пино-нуар симптомы поражения в 2017 г. проявили 16,21% кустов, а в 2019 г. только 7,07% кустов, а поражение кустов сорта Мерло составляло 46,48% в 2017 г. и 10,20% в 2019 г. соответственно.

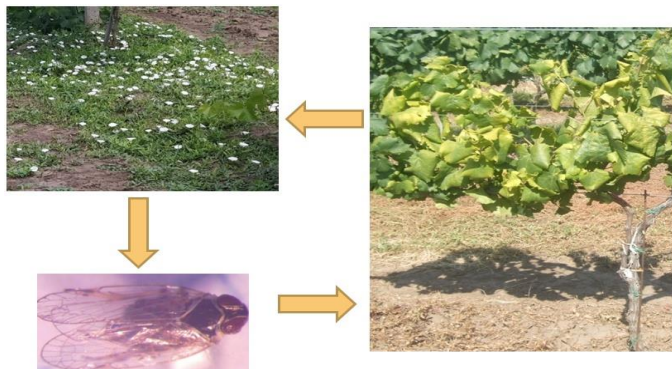
В 2020 году в Республике Молдова была сильная засуха, вследствие которой сильно пострадало сельскохозяйственное растениеводство, в том числе и виноград. Особенно пагубное действие засухи сказалось в южных и центральных районах Республики. Обследование плантации винограда в с. Буджак показало значительное подавление роста однолетних побегов, что отразилось и на развитии заболевания Почернение древесины. Так поражение кустов сорта Рара нягрэ заболеванием в 2020 г. составило 14,9%, в сравнении с 2019 г. снижение составило 24,6%, достигнув уровня 2017 г., на сорте Фетяска нягрэ, наоборот количество поражённых заболеванием кустов увеличилось по сравнению с 2019 г. на 4,3%, а в сравнении с 2017 г. на 9,09% соответственно.

На насаждениях винограда с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на в 2020 г. наблюдается снижение процента поражённых заболеванием кустов в сравнении с 2019 г., а в сравнении с 2017 г. сохраняется тенденция к увеличению поражённых Почернением древесины кустов. Так, на сорте Каберне-совиньон количество больных кустов в 2020 г. снизилось на 6,4% по отношению к 2019 г., а в сравнении с 2017 г. увеличилось на 2,74%. Схожая динамика наблюдается и на сорте Пино-нуар, где снижение количества поражённых кустов в 2020 г. по отношению к 2019 г. составило 27,5%, а в сравнении с 2017 г. увеличилось на 4,27%.

На плантациях винограда с. Тэнэтарь, Каушанского р-на наблюдается ежегодное снижение количества поражённых Почернением древесины кустов винограда. Так количество больных кустов на сорте Каберне-совиньон в 2019 г. составило 12,7%, а в 2020 г. - 9,4% соответственно, уменьшение относительно с 2017 г. составляет 10,15%. Сокращение количества поражённых заболеванием кустов наблюдается и на других сортах данной плантации. Так, количество поражённых кустов на сорте Пино-нуар по сравнению с 2017 г. уменьшилось на 12,81%, а на сорте Мерло - на 42,88% соответственно.

Анализ полученных в результате обследований данных свидетельствует о том, что на участках с. Буджак, АТО Гагаузия и с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на количество поражённых заболеванием кустов увеличивается, в то время как на участках с. Тэнэтарь, Каушанского р-на постепенно уменьшается. Увеличение количества поражённых заболеванием кустов на насаждениях винограда, равно как и их уменьшение можно объяснить тем, что в естественных условиях инфицирование Почернением древесины виноградного растения, на плантациях, происходит посредством цикадки-переносчика *Hyalesthes obsoletus* (Рис. 10). Жизненный цикл цикадки *H. obsoletus* в основном связан с сорными растениями, виноград для неё является случайным растением. Взрослое насекомое откладывает яйца в августе месяце у основания стебля растения-хозяина (Рис. 13). Отродившиеся личинки питаются на корнях растения-хозяина. Если растение было инфицировано фитоплазмой, то отродившиеся личинки, питаясь на корнях инфицированного

растения-хозяина приобретают фитоплазму, и через 30-40 дней становятся вироформными. Личинки цикадки живут в почве питааясь соком корней растений хозяев и, переходя на корневую систему соседних растений, инфицируют их увеличивая, таким образом, количество растений-резервуаров фитоплазмы на плантации. Имаго, образовавшиеся из вироформных личинок, также вироформны.



**Рисунок 13. Инфекционный цикл заболевания Почернение древесины винограда**

Лёт имаго начинается в первой декаде июня следующего года и продолжается до конца месяца. Следует отметить, что в Республике Молдова, вследствие изменения климата, в последние годы, начиная со второй половины июня месяца, значительно повышается дневная температура воздуха и уменьшается количество выпадаемых осадков. Так по данным метеостанций, расположенных на виноградных насаждениях Центральной и Южной зонах промышленного виноградарства страны, за последние четыре года (2017-2020), среднегодовая температура воздуха повысилась на 2,0°C по сравнению со среднемноголетними данными прошлых лет. Сумма эффективных температур в году так же выросла на 446,5°C, относительно среднемноголетнего показателя. В тоже время с повышением температуры и суммы эффективных температур, наблюдается уменьшение количества атмосферных осадков на 147 мм. Вследствие высоких температур и дефицита влаги в почве, травянистые растения быстро грубеют, желтеют и впоследствии высыхают. Поэтому, сосущие насекомые, находящиеся на плантациях винограда и питающиеся соком травянистых растений, среди которых и цикадки-переносчики фитоплазм, вынуждены массово переходить на другие источники питания, одним из которых является активно растущая в данный период времени виноградная лоза. Вироформные цикадки, питааясь соком молодых и сочных побегов, инфицируют их фитоплазмой. Первые симптомы заболевания в виде лёгкого хлороза на инфицированных побегах появляются в начале августа месяца. Чёткие, характерные симптомы фитоплазмоза образуются в конце августа, в начале сентября месяца. Таким образом, климатические изменения являются существенным фактором, способствующим ускорению процесса естественного распространения заболевания Почернение древесины на плантациях винограда в Республике Молдова.



В свете вышеизложенного, можно объяснить рост количества поражённых заболеванием кустов на участках винограда в с. Буджак, АТО Гагаузия и с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на. На плантациях винограда в с. Буджак, АТО Гагаузия в большом количестве присутствует травянистая сорная растительность, среди которой значительное место занимают растения-резерваты фиоплазмы Почернения древесины, Вьюнок полевой и в особенности Цинанхум острый. Некоторые кусты были полностью покрыты плетями данного растения. Наличие на плантации растений-резерватов и цикадок переносчиков фиоплазмы, объясняет ежегодное увеличение количества поражённых Почернением древесины кустов винограда.

На насаждениях винограда в с. Слобозия-Душка, Криулянского р-на применяется залужение междурядий. В качестве травостоя используется сорная растительность, растущая в междурядьях винограда, которую периодически скашивают в течение сезона вегетации. Из растений-резерватов Почернения древесины, наблюдали только Вьюнок полевой, а Цинанхум острый не был обнаружен. Вьюнок полевой — это многолетнее, травянистое растение, с глубоко растущим стержневым корнем, благодаря стелющемуся ветвистому стеблю не подвергался кошению, поэтому повсеместно присутствовал в междурядьях, а также в рядах винограда. Присутствие на плантации источника заболевания и цикад-переносчиков способствует дальнейшему инфицированию кустов винограда заболеванием Почернение древесины.

Ежегодное сокращение количества поражённых Почернением древесины кустов винограда на участках в с. Тэнэтарь, Каушанского р-на связано с тем, что почву на винограднике, в течение всего периода вегетации, поддерживали в свободном от сорных трав состоянии. Борьбу с сорной растительностью осуществляли путём многократных обработок почвы, как в междурядьях, так и в рядах. Из растений резерватов-фиоплазмы наблюдали единичные растения Цинанхум острый. Систематическое удаление сорняков на плантации приводит к удалению резерватов заболевания и личинок цикадки-переносчика питающихся на корнях сорняков. Удаление сорняков приводит к прерыванию цикла растение-резерват – цикадка-переносчик – виноградное растение, что значительно снижает как количество источников фиоплазмы, так и цикад-переносчиков, вследствие чего значительно уменьшается инфекционная нагрузка на плантацию винограда. Следовательно, содержание почвы на плантации винограда без сорняков, в том числе и без растений-резерватов фиоплазмы, является важным фактором в предупреждении распространения заболевания Почернение древесины.

### **3.9. Обсуждение результатов исследований**

Проведёнными исследованиями установлено поражение плантаций винограда в Республике Молдова заболеванием фиоплазменной этиологии Почернение древесины, возбудителем которого является фиоплазма *Candidatus phytoplasma solani*. Поражение плантаций Почернением древесины установлено во всех районах возделывания винограда. Степень поражения плантаций заболеванием варьирует от 0,9 до 100%. На плантациях установлено наличие цикадок -

переносчиков Почернения древесины. По результатам ПЦР диагностики, определены переносчики данного фитоплазменного заболевания: *Hyalesthes obsoletus*, *Anaceratagallia ribauti* и *Reptalus quinquecostatus*. Тестированием цикадок *H. obsoletus* установлено, что 40% из них содержали фитоплазму Почернения древесины. По результатам ПЦР диагностики, травянистых сорных растений, выявлены растения-резервуары фитоплазмы Почернения древесины винограда, к ним относятся: Вьюнок полевой, Цинанхум острый и Марь цельнолистная.

Фитоплазмы вызывающие заболевания растений, являются, внутриклеточными паразитами, поэтому в борьбе с такого рода заболеваниями пока нет химических средств защиты. Выше было отмечено, что развитие фитоплазмоза на винограде проходит следующий цикл: резервуар заболевания - цикада-переносчик - виноград. Остановить дальнейшее распространение заболевания, на винограднике возможно только прервав этот цикл. Данную проблему можно решить агротехническими, химическими и терапевтическими средствами.

Резервуаром фитоплазмы Почернения древесины являются сорняки, растущие на винограднике и прилегающих территориях. На корнях Вьюнка полевой живут, питаются и зимуют личинки *H. obsoletus*. Вылет имаго происходит в июне. Систематическое удаление сорняков на плантации приводит к удалению резервуаров заболевания и личинок цикадки-переносчика, питающихся на их корнях. Данный агроприем приводит к прерыванию цикла резервуар - цикадка переносчик - виноград, что значительно снижает как количество источников фитоплазмы, так и цикад-переносчиков.

Обработки инсектицидами виноградных плантаций способствуют снижению популяции цикад-переносчиков фитоплазмы на винограднике, что в свою очередь также приводит к прерыванию цикла. Исключение из данного цикла переносчика благоприятно скажется на предотвращении распространения заболевания и дальнейшем оздоровлении плантации. Для своевременного проведения обработок необходимо проводить мониторинг лёта насекомых. Первые обработки инсектицидами необходимо проводить против *H. obsoletus* - в период массового вылета имаго. Вторые, а при необходимости последующие обработки, проводят в зависимости от действия препарата и лёта переносчиков на плантации.

Надо понимать, что обработки инсектицидами против *H. obsoletus* только на плантации, не всегда эффективны, по причине того, что данное насекомое полифаг и при питании может отлетать от виноградника на значительные расстояния. Более эффективной мерой борьбы является повышение уровня агротехники: культивации уничтожают особей в ювенильном возрасте, которые находятся в контакте с корнями сорных растений. Что особенно важно учитывая способность личинок к приобретению фитоплазмы от заражённых растений. Применение агротехнических мероприятия по подавлению сорной растительности приведёт к ликвидации травянистых растений - резервуаров фитоплазмы [22; 23].

Данные обследований виноградных насаждений в динамике, с учётом содержания почвы, свидетельствуют о сохранении тенденции к увеличению степени поражения в хозяйствах, где велась не достаточная обработка почвы или залужение.

Рост количества поражённых заболеванием кустов, зависел от следующих факторов: наличие эффективных переносчиков; наличие растений-резерваторов; формирование специфических климатических условий.

Систематическое удаление сорняков на плантации приводит к удалению резерваторов заболевания и личинок цикадки-переносчика, питающихся на их корнях. Подтверждает данный факт обследованные в течение четырёх лет участки винограда в Республике Молдова, которые демонстрируют рост количества поражённых кустов.

Во время проведения фитосанитарного контроля виноградных школок, в питомниководческих хозяйствах, были выявлены растения с симптомами фитоплазменного поражения. В результате молекулярной диагностики саженцев винограда, в 2019 и 2020 гг., была диагностирована фитоплазма Почернения древесины. В целях предупреждения распространения фитоплазменных заболеваний с посадочным материалом применяют горячую водную обработку покоящейся виноградной лозы и саженцев в процессе фитосанитарной селекции винограда в Молдове, при  $t = 50^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин и  $t = 51^{\circ}\text{C}$  в течение 45 минут [24].

Фитоплазмы виноградной лозы не передаются сельскохозяйственными орудиями, контактами листьев, побегов и корней, поэтому при соблюдении определенных профилактических мероприятий виноградник продолжительное время можно сохранить в хорошем фитосанитарном и продуктивном состоянии.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ И ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

### Общие выводы

1. На плантациях винограда в Республике Молдова идентифицировано заболевание фитоплазменной этиологии Почернение древесины. Наличие заболевания установлено во всех зонах возделывания винограда. Заражённость насаждений винограда Почернением древесины варьирует от 0,9 до 100%.
2. Фитоплазма, возбудитель Почернения древесины винограда, диагностирована в растениях *Convolvulus arvensis* L., *Cynanchum acutum* L., *Chenopodium bonus-henricus* L., *Rosa* L., *Ulmus* L., что позволяет определить их как растения-резерваторы заболевания.
3. Фитоплазма, возбудитель Почернения древесины винограда, диагностирована в 3-х видах цикадок: *Hyalesthes obsoletus*, *Anaceratagallia ribauti* и *Reptalus quinquecostatus*, что позволяет отнести их к насекомым-переносчикам заболевания.
4. Тестированием цикадок *H. obsoletus* установлено, что 40% насекомых содержали фитоплазму Почернения древесины. Высокий процент вироформных насекомых свидетельствует о высокой степени заражённости заболеванием растений-хозяев.
5. Секвенированием ДНК, фитоплазмы Почернения древесины винограда, выделенной из поражённых заболеванием кустов винограда, сорного растения *Cynanchum acutum* L. и цикадки *Hyalesthes obsoletus* установлено, что возбудителем заболевания является фитоплазма *Candidatus Phytoplasma solani*.
6. Изменение климатических условий, заключающиеся в повышении температуры и снижении количества осадков в вегетационный период, приводит к преждевременному высыханию травяного покрова, что вынуждает насекомых

полифагов массово переходить на другие растения, в том числе и виноград. Питаясь соком молодых, интенсивно растущих в данный период времени, побегов винограда, вироформные цикадки инфицируют их, способствуя быстрому распространению заболевания Почернение древесины.

7. Систематическое уничтожение на плантациях винограда растений резерваторов фитоплазмы Почернение древесины приводит к избавлению, как от источника заболевания, так и от цикадок-переносчиков, личинки которых питаются на корнях растений хозяев, вследствие чего предупреждается распространение заболевания на другие растения или плантации.

8. Фитоплазма Почернения древесины диагностирована в посадочном материале, поэтому необходимой мерой борьбы с распространением заболевания должен быть фитосанитарный контроль материала для размножения, так как с посадочным материалом происходит распространение патогенна на большие расстояния.

### **Практические рекомендации**

Для предупреждения распространения заболевания Почернение древесины винограда необходимо:

- проводить закладку новых плантаций винограда посадочным материалом-свободным от фитоплазменной, вирусной и бактериальной инфекции;
- не допускать наличия на насаждениях винограда и прилегающих территориях растений-резерваторов: *Convolvulus arvensis* L., *Cynanchum acutum* L., *Chenopodium bonus-henricus* L., *Rosa* L., *Ulmus* L. Содержание плантации винограда без сорной растительности в течение периода вегетации, лишает цикадку-переносчика возможности отложить яйца на растении-хозяине. Поэтому, очень важно обрабатывать почву не только в междурядьях, но и в ряду;
- исключить для залужения междурядий винограда естественно растущие травянистые сорные растения, так как среди них могут присутствовать и растения резерваторы фитоплазмы Почернения древесины винограда;
- проводить мониторинг лёта цикадок, для своевременного применения химических обработок против переносчиков;
- в целях предупреждения инвазии вироформных цикадок-переносчиков фитоплазмы Почернение древесины винограда, необходимо проводить краевые обработки инсектицидами плантаций винограда и прилегающих территорий в период их массового лёта;
- для борьбы с цикадками – переносчиками фитоплазмы необходимо использовать селективные инсектициды, обработки необходимо проводить и на границах плантаций виноградников и прилегающих территориях. Период между проводимыми обработками должен зависеть от наличия переносчиков на плантации, эффективности и срока действия используемых химических препаратов.

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Albanese, G., Granata, G., Collodoro, S., *Detection of a phytoplasma in Psammotettix striatus*. In: Vitis vinifera – Sicily, Catania Univ. (Italy) Istituto di Patologia Vegetale, D'Urso, V. (Catania Univ. (Italy) Dipartimento di Biologia Animale). In: Informatore Fitopatologico, 1997, nr.74, pp. 57-60.
2. Angelini, E., Clair, D., Borgo, M., Bertaccini, A., Boudon-Padieu, E., „Flavescence dorée” in France and Italy – occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatine grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. In: Vitis, 2001, nr.40, pp.79–86.
3. Bondarciuc, V., Filippin, L., **Hautov, E.**, Forte, V., Angelini, E., *Survey on grapevine yellows and their vectors in the Republic of Moldova*. In: Congress of the International Council for the study of Virus and Virus-like Diseases of Grapevine. Proceedings of the 19th, 9-12 April. Santiago, Chile, 2018. pp. 148-149, [https://icvg.org/data/2018\\_proceedings.pdf](https://icvg.org/data/2018_proceedings.pdf), (vizitat 13.04.2022).
4. Boudon-Padieu, E., Larue, J., Caudwell, A., *ELISA and Dot-Blot detection of Flavescence dorée MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state*. In: Curr. Microbiol, 1989, nr. 19, pp. 357-364.
5. Dehghan, S., Salehi, M., Khanchezar, A., Rastegari, N., Salari, M., *Transmission characteristics of lettuce phyllody phytoplasma by Neolittoridius fenestratus IN FARS*. In: Iran. J. Plant Path., 2012, vol. 48, No. 1, pp. 35-36.
6. Euphresco, Project ID: *Tracking vectors of bacteria and phytoplasmas threatening Europe’s major crops (VECTRACROP)*, May 2017.
7. Grylls, N.E., *Leafhopper vectors and the plant disease agents they transmit in Australia*. In: Maramorosch, K., Harris, F.K. (eds) *Leafhopper vectors and plant disease Agents*. In: Academic Press, New York, 1979, pp. 179-214.
8. **Hautov, E.**, Bondarciuc, V., *Hyalesthes obsoletus is an active vector of Wood blackening in the Republic of Moldova*. In: International Scientific Conference “Biologization of the Intensification Processes in Horticulture and Viticulture”, № 34, September 21-23. Krasnodar, Russia, 2021, pp. 1-6. ISSN: 2587-3555. DOI: [https://doi.org/10.1051/bioconf/202106bioconf/biphv/2021\\_04020.pdf](https://doi.org/10.1051/bioconf/202106bioconf/biphv/2021_04020.pdf), (vizitat 13.04.2022). [https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/pdf/2021/06/bioconf\\_biphv\\_2021\\_04020.pdf](https://www.bio-conferences.org/articles/bioconf/pdf/2021/06/bioconf_biphv_2021_04020.pdf).
9. Jung, H.-Y., Sawayanagi, T., Wongkaew, P., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W., Oshima, K., Miyata, S.-I., Ugaki, M., Hibi, T., Namba, S., „*Candidatus Phytoplasma oryzae*”, a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. In: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, nr. 53, pp. 1925-1929.
10. Matteoni, J. A., and Sinclair, W. A., *Elm yellows and ash yellows*. In: Tree Mycoplasmas and Mycoplasma Diseases. C. Hiruki, ed. University of Alberta, Edmonton, Canada, 1988, pp.19-31.
11. Orsagova, H., Brezikova, M., Schlesingerova, G., *Presence of phytoplasmas in hemipterans in Czech vineyards*. In: Bulletin of Insectology 64 (Supplement): S119-S120, 2011, ISSN 1721-8861
12. Qualiplante SAS, DUPLEX NESTED END-POINT PCR KIT Dytection of Flavescence dorée and Bois noir Cap Alpha, Avenue de l'Europe, review 02 -11/06/2015, pp. 1-3.
13. Riedle, M., Sara, A., Regner, F., *Transmission of a Stolbur Phytoplasma by the Agalliinae Leafhopper Anaceratagallia ribauti (Hemiptera, Auchenorrhyncha, Cicadellidae)*. In: Journal of Phytopathology, 2008, nr. 156(11-12), pp. 687-690. 177
14. Salehi, M., Izadpanah, K., Nejat, N., *A new phytoplasma infecting lettuce in Iran*. In: Plant Disease, 2006, nr. 90, p.247.
15. Terlizzi, F., Credi, R., *Uneven distribution of „stolbur” phytoplasma in Italian grapevines revealed by nested-PCR*. In: Bull Insectol, 2007, nr. 60, pp. 365-366.
16. Timuş, A., Mihailov, I., Popa, L., *New outbreaks of Scaphoideus titanus (Homoptera, Cicadellidae) in vineyard culture from Republic of Moldova*. In: Revista Agrobuletin, 2013, Anul V nr. 3,4 (17), p. 61-66.
17. Timuş, A.M., *The invasive entomofauna of the hemimetabola group for Republic of Moldova*. In: Current Trends in Natural Sciences, 2015, nr. 4, pp. 32-40.
18. Wei, K., Yuan, F., *Gene expression profiles in Malpighian tubules of the vector leafhopper Psammotettix striatus (L.) revealed regional functional diversity and heterogeneity*. In: BMC Genomics, Nr. 23:67, 2022, p.1. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08300-6>
19. Wilson, M. R. & Turner, J. A., *Leafhopper, Planthopper and Psyllid Vectors of Plant Disease*. Amgueddfa Cymru – National Museum Wales, 2010, Available online at <http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/Vectors>.

20. Wu, Y., Hao, X., Li, Z., Gu, P., An, F., Xiang, J., Wang, H., Luo, Z., Liu, J., Xiang, Y., *Identification of the phytoplasma associated with wheat blue dwarf disease in China*. In: Plant Dis., 2010, nr. 94, pp. 977-985.
21. Ануфриев, Г. А., Емельянов, А. Ф., *Подотряд Cicadinea (Auchenorrhyncha) – Цикадовые*, В: Определитель насекомых Дальнего востока СССР. Равнокрылые и полужесткокрылые. Л., «Наука», 1988, Т.2, с.12-495.
22. Бондарчук, В., Хаустов, Е., *Агротехнический метод предупреждения распространения почернения древесины винограда*. В: Русский виноград. Сборник научных трудов, Том 14. Новочеркасск, 2020, стр. 51-60. ISSN: 2412-9836; УДК 634.8:576.858:632. DOI:10.32904/2712-8245-2020-14-51-60.
23. Бондарчук, В., Хаустов, Е., *Фитоплазмоз виноградной лозы в Молдове*. În: Agroexpert, №1, Кишинев, 2020, стр. 84-92. ISSN:2587-3555, <https://agroexpert.md/rus/agromenedzhment/fitoplazmoz-vinogradnoy-lozy-v-moldove>, vizitat (12.04.2022).
24. Дубчак, М., Хаустов, Е., Султанова, О., Бондарчук, В., *Горячая водная терапия в фитосанитарной селекции винограда*, В: Русский виноград. Сборник научных трудов, Том 13, Новочеркасск, 2020, с. 16-24. ISSN: 2412-9836; УДК 634.8:632.953. DOI: 10.32904/2412-9836-2020-13-16-24, <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43983251>, vizitat (13.04.2022).
25. Международная генетическая база данных NCBI [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, vizitat (19.04.2022).
26. Хаустов, Е., Бондарчук, В., *Выявление фитоплазмы Candidatus Phytoplasma Solani на плантациях винограда в Республике Молдова*. În: Simpozionului Științific Internațional „Sectorul agroalimentar – realizări și perspective”. 19-20 noiembrie. Кишинев, 2021.
27. Хаустов, Е., Дубчак, М., Бондарчук, В., *Почернение древесины – фитоплазменное заболевание винограда в Республике Молдова*. В: Русский виноград. Сборник научных трудов, Новочеркасск, Том 12, 2020, с. 33-40. ISSN: 2412-9836; УДК 634.8:576.858:632. DOI: 10.32904/2412-9836-2020-12-33-40, <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=43983603>, vizitat (13.04.2022).
28. Хаустов, Е., *Распространение почернения древесины винограда в естественных условиях*. În: Conferință științifică a studenților. ed. 74. Chișinău. 2021. p. 51. ISBN: 978-9975-64-320-7, [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144951](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144951), vizitat (13.04.2022).
29. Хаустов, Е., *Цикадки переносчики фитоплазменного заболевания почернение древесины (Bois Noir) в Республике Молдова*. Agricultural science, 2023, (1), 66–74. <https://doi.org/10.55505/sa.2023.1.07>, <https://press.utm.md/index.php/as/article/view/107>, vizitat (21.09.2023).

## АННОТАЦИЯ

**Хаустов Евгений.** «Заболевания виноградной лозы фитоплазменной этиологией», диссертация на соискание учёной степени доктора сельскохозяйственных наук, Кишинёв, 2023.

**Структура диссертации:** введение, три главы, общие выводы и практические рекомендации, 112 страниц основного текста, 35 рисунков, 22 таблиц, 20 приложений, 243 библиографических источника. Результаты опубликованы в 9 научных работах.

**Ключевые слова:** фитоплазма, Почернение древесины, Золотистое пожелтение, виноград, симптомы фитоплазменного заболевания, мониторинг, цикадки-переносчики, растение-резерватор фитоплазмы, ПЦР.

**Область исследований:** Защита растений.

**Цель работы:** разработать меры борьбы для защиты виноградных насаждений от фитоплазменных заболеваний в Республике Молдова.

**Задачи исследования:** обследовать виноградные насаждения для определения степени заражения фитоплазменными заболеваниями, идентифицировать фитоплазменных патогенов-возбудителей заболевания винограда и изучить резерваторов и возможных переносчиков фитоплазменных заболеваний в Республике Молдова.

**Новизна исследований:** впервые в Республике Молдова определено распространение фитоплазменного заболевания во всех виноградарских зонах и установлен возбудитель, переносчики и сорные растения-резерваторы. Составлены рекомендации по мерам борьбы и предотвращению распространения заболевания.

**Решённая важная научная проблема:** состоит в изучение фитоплазменных заболеваний виноградной лозы, выявлении цикадок переносчиков, а также растений-резерваторов заболевания, что позволило представить рекомендации по мерам борьбы.

**Теоретическое значение работы:** высокая степень поражения плантаций винограда в Республике Молдова фитоплазменным заболеванием, возможна при наличии источника заболевания, эффективного переносчика и факторов, способствующих заражению виноградного растения.

**Практическое значение работы:** состоит в представлении научно-обоснованных мер по предупреждению распространения заболевания на плантациях винограда в РМ.

**Внедрение научных результатов:** результаты внедрены в лаборатории вирусологии и фитосанитарного контроля НПИСВиПТ и применяются в работах по получению фитосанитарных клонов винограда.

## ADNOTARE

**Haustov Evghenii. „Bolile viței de vie de etiologie fitoplasmatică”, teză de doctor în științe agricole, Chișinău, 2023.**

**Structura tezei:** introducere, trei capitole, concluzii generale și recomandări, 112 de pagini de text de bază, 20 anexe, 35 de figuri, 22 tabele, bibliografie din 243 titluri. Rezultatele obținute sunt publicate în 9 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** fitoplasma, înnegrirea lemnului, îngălbenirea aurie, vița de vie, simptomele produse de fitoplasmoze, monitorizare, cicadela-vector, plantă-rezervor de fitoplasmă, RPL.

**Domeniul de studiu:** Protecția plantelor.

**Scopul tezei:** elaborarea și recomandarea măsurilor de control pentru prevenirea îmbolnăvirii cu fitoplasmoze și protecția generală a plantațiilor viticole în Republica Moldova.

**Obiectivele cercetării:** investigarea plantațiilor viticole pentru determinarea gradului de infectare cu patogenul de etiologie fitoplasmatică; identificarea agenților patogeni de tip fitoplasma, care declanșează fitoplasmozele viței de vie; studierea plantelor-gazde spontane, rezervoare de fitoplasmă; cercetarea speciilor de cicadele-vectori, cu potențial fiziologic în transmiterea patogenilor de etiologie fitoplasmatică în Republica Moldova.

**Noutatea cercetării:** pentru prima dată în Republica Moldova a fost determinată aria de răspândire a fitoplasmozelor în zonele viticole industriale și a fost identificat agentul patogen, vectorii și plantele-rezervoare cu fitoplasmă. Au fost elaborate și înaintate recomandări cu referință la măsurile necesare de respectat pentru combaterea și limitarea răspândirii fitoplasmoselor în plantațiile viticole.

**Problemă științifică importantă rezolvată:** investigarea fitoplasmozelor viței de vie, identificarea speciilor de cicadele-vectori, precum și a plantelor-gazdă alternative purtătoare de fitoplasmă, ceea ce a făcut posibil recomandarea măsurilor și metodelor de combatere a patologiilor fitoplasmatică ale viței de vie.

**Semnificația teoretică a lucrării:** nivelul ridicat de infectare a plantelor de viță de vie din Republica Moldova cu o boală fitoplasmatică, este posibilă dacă există o sursă semnificativă a patogenului în agrobiotop, un vector eficient pentru vehiculare și factorii climatici favorabili în perioada de vegetație, care împreună contribuie la declanșarea infectării plantelor de viță de vie cu agentul patogen respectiv.

**Semnificația practică a lucrării:** prezentarea măsurilor și metodelor de prevenire și combatere a patologiilor fitoplasmatică în plantațiile viticole din Republica Moldova bazate pe investigații științifice.

**Implementarea rezultatelor științifice:** rezultatele științifice au fost implementate în plantațiile viticole din gestiunea laboratorului de virologie și control fitosanitar al IȘPHTA și utilizate în tehnologiile de obținere a clonelor fitosanitare de viță de vie libere de patogen.



## ABSTRACT

**Haustov Evghenii. «Grapevine diseases of phytoplasmic etiology», thesis for the degree of Doctor of Agricultural Sciences, Chisinau, 2023.**

**Thesis structure:** introduction, three chapters, general conclusions and practical recommendations, 112 pages of main text, 35 figures, 22 tables, 20 appendices, 243 bibliographic sources. The results are published in 9 scientific papers.

**Key words:** phytoplasma, Blackening of wood, Golden yellowing, grapevine, symptoms of phytoplasma disease, monitoring, leafhoppers-vectors, plant - phytoplasma reservoir, PCR.

**Research area:** Plant protection.

**The aim of the work:** to develop control measures to protect vineyards from phytoplasma diseases in the Republic of Moldova.

**Research objectives:** to examine vineyards to determine the degree of infection with phytoplasmic diseases, to identify phytoplasmic pathogens - causative agents of grapevine diseases and to study the reservoirs and possible carriers of phytoplasmic diseases in the Republic of Moldova.

**The novelty of the research:** for the first time in the Republic of Moldova, the spread of phytoplasma disease in all viticultural zones was determined, as well as the pathogen, vectors and weeds-reservoirs. Recommendations were made on measures to control and prevent the spread of the disease.

**An important scientific problem solved:** is the study of phytoplasmic diseases of the vine, the identification of carriers of leafhoppers, as well as plant-reservoirs of the disease, which made it possible to provide recommendations on control measures.

**The theoretical significance of the work:** a high degree of infection of grape plantations in the Republic of Moldova with a phytoplasma disease is possible if there is a source of the disease, an effective vector and factors contributing to the infection of the grape plant.

**The practical significance of the work:** consists in presenting evidence-based measures to prevent the spread of the disease on grape plantations in the Republic of Moldova.

**Implementation of scientific results:** the results have been implemented in the laboratory of virology and phytosanitary control of ISPHTA and are used in work on obtaining phytosanitary clones of grapes.

**ХАУСТОВ ЕВГЕНИЙ**

**ЗАБОЛЕВАНИЯ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ  
ФИТОПЛАЗМЕННОЙ ЭТИОЛОГИИ**

**411.09 ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ**

Автореферат диссертации на соискание  
учёной степени доктора сельскохозяйственных наук

---

Aprobat spre tipar: data: 06.11.2023  
Hîrtie ofset. Tipar digital  
Coli de tipar.: 2,0

Formatul hîrtiei A4  
Tiraj 40 ex.  
Comanda nr. 166

---

SRL "Print-CARO" Chişinău, str. Columna, 170. tel. 0691-24-696