

**ВЫЯВЛЕНИЕ ФИТОПЛАЗМЫ *CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI* НА
ПЛАНТАЦИЯХ ВИНОГРАДА В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА**

**DETECTIA FITOPLASMEI *CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI* ÎN
PLANTAȚIILE VITICOLE DIN REPUBLICA MOLDOVA**

**DETECTION OF *CANDIDATUS PHYTOPLASMA SOLANI* ON GRAPE PLANTS IN
THE REPUBLIC OF MOLDOVA**

HAUSTOV EVGHENII, BONDARCIUC VICTOR

Institutul Științifico-Practic de Horticultura și Tehnologii Alimentare

Abstract. În plantațiile viticole din Republica Moldova boala fitoplasmică Înnegrirea lemnului (*Bois noir*) s-a răspândit pe scară largă. Simptomele caracteristice bolii au fost observate practic la toate soiurile de viță de vie cultivate în țară. Pentru identificarea agentului patogen al bolii s-a efectuat secvențierea ADN-lui fitoplasmei, izolat din frunzele afectate de viță de vie, din buruiana *Fallopia convolvulus* L., precum și din cicada - vector *Hyalesthes obsoletus* (Signoret). În urma studiilor efectuate s-a stabilit prezența fitoplasmei *Candidatus Phytoplasma solani* în probele investigate de viță de vie, buruieni și cicade. Rezultatele obținute privind prezența fitoplasmei în plantele de viță de vie, buruieni și cicade sunt în acord cu datele privind răspândirea largă a bolii fitoplasmice în plantațiile din RM și confirmă rolul cicadei - vector în distribuția acesteia.

Cuvinte cheie: fitoplasma, Înnegrirea lemnului, PCR, vector, buruiana

Абстракт. На плантациях винограда Республики Молдова широкое распространение получило фитоплазменное заболевание Почернение древесины (*Bois noir*). Симптомы заболевания обнаружены практически на всех возделываемых в Республике сортах винограда. В целях дальнейшей

идентификации возбудителя заболевания проведено секвенирование ДНК фитоплазмы выделенной из пораженных листьев винограда и сорного растения Горец вьюнковый (*Fallópia convólulus L.*), а также цикадки-переносчика *Hyalesthes obsoletus (Signoret)*. В результате проведенных исследований установлено присутствие в исследованных пробах винограда, сорного растения и цикадки фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani*. Полученные результаты о наличии данной фитоплазмы в виноградной лозе, сорном растении и цикадке – переносчике согласуются с данными о широком распространении фитоплазменного заболевания на насаждениях винограда в РМ и подтверждает роль цикадки-переносчика в его распространении.

Ключевые слова: фитоплазма, Почернение древесины, ПЦР, цикадка-переносчик, сорное растение

Abstract. The phytoplasmic disease Bois noir is widespread on the vineyards of the Republic of Moldova. Symptoms of the disease were found on almost all grape varieties cultivated in the Republic, as well as on a number of herbaceous and shrub plants. In order to further identify the causative agent of the disease, DNA sequencing of the phytoplasm was carried out, which was isolated from the affected leaves of grapes and the weed (*Fallópia convólulus L.*), as well as the leafhopper-carrier *Hyalesthes obsoletus (Signoret)*. As a result of the research in the investigated grape samples, the presence of a weed plant and a leafhopper of the phytoplasm *Candidatus Phytoplasma solani* were established. The results obtained on the presence of this phytoplasm in grapevines, weeds and leafhoppers are consistent with the data on the widespread occurrence of phytoplasmic diseases on vine plantations in the RM and show the importance of the leafhopper carrier in its distribution.

Key words: phytoplasm, Bois noir, PCR, vector, weeds

ВВЕДЕНИЕ

В Республике Молдова симптомы заболевания фитоплазменной этиологии обнаружены на европейских и автохтонных сортах винограда во всех районах его выращивания. Тестированием методом ПЦР проб листьев пораженных заболеванием кустов винограда определена фитоплазма Почернения древесины (Bondarciuc, et al., 2018; Бондарчук, Хаустов, 2020). Особую опасность для отрасли представляет высокий процент поражения молодых виноградников (Haustov, Bondarciuc, 2021). В настоящее время заболевания относящиеся к Желтухам винограда, являются одними из наиболее вредоносных в виноградарских областях мира.

Фитоплазменные заболевания разделены на филогенетические группы, одни из самых вредоносных: астровые пожелтения - *16SrI*, (*aster yellows, AY*), пожелтения вяза - *16SrV*, (*elm yellows, EY*) и фитоплазма столбура *16SrXII* – (*Stolbur*). В свою очередь, каждую группу представляют штаммы, которые распространены и локализованы в конкретных географических регионах. При поражении виноградного растения фитоплазмозом, наносимый ущерб зависит от штамма возбудителя.

Для исследования видов фитоплазм применяют филогенетический анализ. Биологическую классификацию проводят на основе одного общего для всех исследуемых организмов фрагмента ДНК. Ранее не описанных возбудителей фитоплазмозов, в зависимости от нуклеотидного состава этого гена, относят к существующей подгруппе, или выделяют в новую (Kirkpatrick et al., 1994). По мере изучения новых видов фитоплазм выявляют новые подгруппы, а старые редактируют и дополняют (Seemüller et al., 1994). База данных фитоплазм ежегодно пополняется новыми видами. Так в 2011 году фитоплазмы были разделены на 28 рибосомных таксономических групп (Vertaccini et al., 2011), а по последним данным уже на 44 рибосомных таксономических групп, (Namba, 2017; 2019) и более 100 подгрупп (IPWG, 2015; Bosco, Marzachi, 2016). Виды фитоплазм обозначаются римскими цифрами (Davies, Lee, 1993). Так к заболеванию «желтухи винограда» относят, по меньшей мере, 24 фитоплазменных возбудителей, разделённых по следующим таксономическим группам: *16SrI*, *16SrII*, *16SrIII*, *16SrV*, *16SrIX*, *16SrX*, *16SrXII*, *16SrXXIII*.

Существует высокая специфичность насекомых, в процессе передачи фитоплазмы растениям, что предусматривает селективную связь между определенной фитоплазмой и видами переносчиков. основополагающим фактом в распространении фитоплазмы является

отношение между векторами – полифагами с растениями – резерваторами. Взаимодействия переносчик – растение хозяин играют важную роль, как в ограничении, так и в расширении распространения фитоплазм. Изучение роли цикад-переносчиков в распространении фитоплазменного заболевания винограда в Республике Молдова проводили при обследовании плантаций на предмет поражения фитоплазмозом. Исследованием проб насекомых, собранных с различных плантаций винограда установлено повсеместное наличие цикадки *Hyalesthes obsoletus* (Signoret). Тестированием отловленных цикадок *H. obsoletus* на наличие фитоплазмы возбудителя заболевания, установлено, что 40% особей содержали фитоплазму Почернения древесины (Haustov, Bondarciuc, 2021).

Применяемые методы диагностики фитоплазм должны работать на всех вариантах генотипов одного вида, в противном случае возможна большая вероятность получения ложноотрицательных результатов лабораторной диагностики. Идентификация возбудителей фитоплазменных заболеваний винограда в РМ, имеет первостепенное значение для оптимизации методов диагностики, что в свою очередь играет важную роль в контроле за их распространением.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследований служили изоляты ДНК фитоплазмы относящиеся к Почернению древесины винограда, полученные в процессе тестирования методом Вложенной ПЦР проб листьев, сорных растений и цикадок отобранных в период обследования плантаций винограда на предмет поражения фитоплазменными заболеваниями.

Для извлечения ДНК из тканей проб виноградной лозы применяли метод Angelini et al., 2001, *Vitis* 40: 79-86. Молекулярный анализ проведён методом Вложенной ПЦР (Duplex Nested End - Point PCR, French Official method - англ.), коммерческим набором от Qualiplant (Flavescence dorée / Bois noir, с франц.), для первой амплификации применены праймеры: FD9f / FD9r 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. Для визуализации продукта ПЦР, применён фильтр трансиллюминатора, излучающий ультрафиолетовый свет.

Определение молекулярного веса ДНК проводили с помощью программного обеспечения “Quantity One ®”. Работа по секвенированию выполнена в научно-производственной компании «СИНТОЛ».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Изоляты ДНК фитоплазмы относящиеся к Почернению древесины винограда, использованные для секвенирования, имели следующее происхождение: 2 изолята выделены из листьев винограда с симптомами фитоплазменного поражения, и по одному изоляту из сорного растения - Горец вьюнковый и цикадки *H. obsoletus* соответственно (Рисунок 1, 2). Пробы листьев винограда были отобраны с виноградной школки в Страшенском районе, село Кожушна, сорт Алиготе и с промышленного насаждения в Штефан-Водском районе, село Пуркары, сорт Рара-нягрэ. Сорное растение Горец вьюнковый (*Fallopia convolvulus* L.) отобрано в Чимишлийском районе, на плантации винограда сорта Шардоне. Цикадка *H. obsoletus* отловлена на винограднике в Яловенском районе.

В результате проведённого секвенирования четырёх изолятов ДНК получены их нуклеотидные последовательности в текстовом виде. Анализ нуклеотидных последовательностей исследуемых ДНК в сравнении с данными генетической базы NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) представлены в таблице 1. Определён один вид патогенна, в разных исследуемых объектах, которые объединены в общую цепочку распространения фитоплазмы: резерватор – переносчик – виноградная лоза.



Рис. 1. Симптомы фитоплазменного заболевания: слева - на листьях сорта Рара нягрэ; справа на саженце винограда сорта Алиготе.



Рис. 2. Симптомы фитоплазменного заболевания на сорном растении Горец вьюнковый (*Fallopia convolvulus* L.) (слева), цикадка *Nyalesthes obsoletus* (справа).

Таблица 1. Результаты секвенирования ДНК с помощью праймеров STOL11f3 / STOL11r2

№	Исследуемый материал	Местоположение и № образца	Результат ПЦР анализа	Прочтение, %	Идентификация, %	Идентификация по базе данных NCBI
1	Алиготе (лист)	Страшенский р-н, виноградная школка	<i>Bois noir</i>	87	87	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>
2	Рара нягрэ (лист)	Штефан-Водский р-н,	<i>Bois noir</i>	98	98	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>
3	<i>Fallopia convolvulus</i> L. (лист)	Чимишлийский р-н,	<i>Bois noir</i>	99	91	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>

№	Исследуемый материал	Местоположение и № образца	Результат ПЦР анализа	Прочтение, %	Идентификация, %	Идентификация по базе данных NCBI
4	<i>Hyalesthes obsoletus</i> (имаго ♂)	Яловенский р-н	<i>Bois noir</i>	99	96	<i>Candidatus Phytoplasma solani</i>

Как видно из таблицы 1, полученные результаты секвенирования образцов ДНК, выделенных из листьев винограда с симптомами фитоплазмоза (Алиготе и Рара нягрэ), сорного растения Горец вьюнковый и цикадки *H. obsoletus* подтвердили идентифицированную фитоплазму из группы *Stolbur*, а именно возбудителя Почернения древесины винограда *Candidatus Phytoplasma solani*. Достоверность идентификации фитоплазмы в проведенных исследованиях достаточно высокая. Так, процент прочтения последовательностей при секвенировании фитоплазмы из сорта Алиготе составляет 87%, и индефикации также 87%, а из сорта Рара нягрэ 98 и 98% соответственно. В опытах с фитоплазмой из *Fallopia convolvulus* достоверность еще выше и составляет 99%, и индефикации также 91%, а из *H. obsoletus* 99 и 96% соответственно. Идентификация фитоплазмы *Ca. P. sol.* в листьях винограда пораженных фитоплазмозом, а также в сорном растении Горец вьюнковый (*Fallopia convolvulus* L.) и в цикадке *H. obsoletus* свидетельствует о том, что заболевание виноградной лозы Почернение древесины (*Bois noir*) в естественных условиях распространяется цикадкой-переносчиком. Полученные результаты исследований подтверждают данные о широком распространении фитоплазменного заболевания Почернение древесины на плантациях винограда в Республике Молдова.

ВЫВОДЫ

Секвенированием ДНК подтвердили идентифицированную фитоплазму из группы *Stolbur*, в частности возбудителя Почернения древесины винограда *Ca. P. sol.* в листьях винограда сортов Алиготе и Рара нягрэ, сорном растении Горец вьюнковый (*Fallopia convolvulus* L.) и в цикадке *H. obsoletus*.

В Республике Молдова впервые были получены нуклеотидные последовательности фитоплазмы возбудителя заболевания Почернение древесины *Ca. P. sol.*, выделенной из виноградной лозы, сорного растения и цикадки – переносчика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bertaccini A., Duduk B. Phytoplasma classification: Taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? // Phytopathogenic Mollicutes, 2011, Vol. 1(1), P. 3-13.
2. Bondarciuc V., Filippin F., Haustov E., Forte V., Angelini E., Survey on grapevine yellows and their vectors in the Republic of Moldova”, Proceedings of the 19th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine(ICVG), April 2018 - Santiago, Chile
3. Bosco D., Marzachi C., 2016, CHAPTER 22: Insect Transmission of Phytoplasmas
4. Davies D.L., Lee I.M. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma-like organisms // Phytopathology. – 1993, Vol. 83, P. 1008-1011.
5. Haustov E., Bondarciuc V., Hyalesthes obsoletus is an active vector of Wood blackening in the Republic of Moldova, BIO Web of Conferences 34, 04020 (2021), <https://doi.org/10.1051/bioconf/20213404020>
6. IPWG (International Phytoplasma Working Group). n.d. Phytoplasma collection web page. Available at http://www.ipwgnat.org/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=5
7. Kirkpatrick B.C., Smart C., Gardner S., Gao J.L., Ahrens U., Maurer R., Schneider B., Lorenz K.H., Seemüller E., Harrison N.A., Namba S., Daire X. Phylogenetic relationship of plant pathogenic MLOs established by 16/23S rDNA spacer sequences // IOM Let, 1994, Vol.3., P.233-237.
8. Namba S. (2017) Phytoplasma. University of Tokyo Press, Tokyo (in Japanese).
9. Namba S. (2019) Molecular and biological properties of phytoplasmas, Proc Jpn Acad Ser B Phys

Biol Sci, 2019 Jul 31; 95(7): 401–418. doi: 10.2183/pjab.95.028

10. Seemüller E., Schneider B., Maurer R., Ahrens U., Daire X., Kison H., Lorenz K.-H., Firrao G., Avinent L., Sears B.B., Stackebrandt E. Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA // International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, Vol.44 (3), P. 440-446.

11. Бондарчук В.В., Хаустов Е.И., Агротехнический метод предупреждения распространения Почернения древесины винограда, Русский виноград, том 14, стр.51-60, 2020