

Болезни древесины винограда в Крыму

Галкина Е.С.¹, Алейникова Н.В.^{1✉}, Радионовская Я.Э.¹, Болотьянская Е.А.¹, Белаш С.Ю.¹, Аршава Н.В.², Божко К.Н.², Каракотов С.Д.²

¹Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Россия, 298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, 31;

²АО «Щелково Агрохим», Россия, 141108, Московская обл., г. Щелково, ул. Заводская, 2, корп. 142

✉aleynikova@magarach-institut.ru

Аннотация. На современном этапе развития сельскохозяйственного производства обеспечение стабильной экономической эффективности виноградарства возможно при предотвращении снижения жизнеспособности виноградных растений, которое сопровождается уменьшением их продуктивности и сокращением сроков эксплуатации. Прогрессирующее ослабление виноградной лозы может быть вызвано как изменениями климата, так и поражением многолетней древесины комплексами фитопатогенных грибов. В последние годы во всех основных странах, занимающихся возделыванием винограда, к наиболее значимым болезням многолетней древесины относят эску, эутипиоз, эскориоз (черная пятнистость), ботриосферное отмирание и корневую гниль «чёрная ножка винограда». В работе представлены результаты полевых и лабораторных исследований 2016–2022 гг., направленных на изучение этиологии и эпидемиологии, уточнение диагностических признаков системных болезней многолетней древесины на виноградниках Крыма. Установлены особенности распространения и частота встречаемости данных болезней в зависимости от абиотических факторов и сортового состава виноградников. Показано увеличение интенсивности поражения проводящей системы винограда комплексами грибов, вызывающих болезни многолетней древесины, на фоне абиотического стресса, вызванного резкими колебаниями температур воздуха и режимом увлажнения в течение вегетации. Выделены и диагностированы возбудители ботриосферного отмирания винограда. В рамках разработки методов идентификации использование молекулярно-биологического подхода на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило определить возбудителей эутипиоза, эски винограда и черной пятнистости (эскориоза), а также подтвердить их распространение на виноградниках Крыма.

Ключевые слова: виноград; болезни многолетней древесины; эска; эутипиоз; ботриосферное отмирание; черная пятнистость; этиология; эпидемиология.

Для цитирования: Галкина Е.С., Алейникова Н.В., Радионовская Я.Э., Болотьянская Е.А., Белаш С.Ю., Аршава Н.В., Божко К.Н., Каракотов С.Д. Болезни древесины винограда в Крыму // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2023;25(2):193-200. DOI 10.34919/IM.2023.25.2.013.

О R I G I N A L R E S E A R C H

Grapevine trunk diseases in Crimea

Galkina Ye.S.¹, Aleinikova N.V.^{1✉}, Radionovskaya Ya.E.¹, Bolotianskaia E.A.¹, Belash S.Yu.¹, Arshava N.V.², Bozhko K.N.², Karakotov S.D.²

¹All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russia

²Joint Stock Company «Shchelkovo Agrokhim», 2 Zavodskaya str., bldg. 142, 141101 Shchelkovo, Moscow region, Russia

✉aleynikova@magarach-institut.ru

Abstract. At the present stage of agricultural industry development, the provision of stable economic efficiency of viticulture is possible with preventing a decrease in grape plant viability, accompanied by a decrease in productivity and working life. Progressing weakening of the vine can be caused by both climate change and damage to perennial trunk by the complex of phytopathogenic fungi. In recent years, in all major countries involved in grape cultivation, the most significant diseases of perennial trunk are esca, Eutypa dieback, escuriosis (black spot), botriospheric dieback and black stem root rot. The article presents the results of field and laboratory studies in 2016–2022 aimed at etiology and epidemiology, specification of diagnostic signs of systemic diseases of perennial grapevine trunk in the vineyards of Crimea. The features of distribution and frequency of occurrence of these diseases depending on abiotic factors and the varietal composition of vineyards were established. An increase in the damage intensity to the conductive system of grapes by the complex of fungi that cause diseases of perennial grape trunk is shown against the background of abiotic stress caused by acute fluctuations in air temperature and precipitation regime during the growing season. Causative agents of botriospheric dieback of grapes were isolated and identified. As a part of identification method development, using of molecular biological approach based on the polymerase chain reaction (PCR) made it possible to identify the pathogens of Eutypa dieback, grape esca and black spot (escuriosis), as well as to confirm their progression in the vineyards of Crimea.

Key words: grapes; diseases of perennial trunk; esca; Eutypa dieback; botriospheric dieback; black spot; etiology; epidemiology.

For citation: Galkina Ye.S., Aleinikova N.V., Radionovskaya Ya.E., Bolotianskaia E.A., Belash S.Yu., Arshava N.V., Bozhko K.N., Karakotov S.D. Grapevine trunk diseases in Crimea. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2023;25(2):193-200. DOI 10.34919/IM.2023.25.2.013 (in Russian).

Введение

Виноградарство является перспективным, активным развивающимся сегментом российского агропромышленного комплекса и играет важную роль в экономике южных регионов Российской Федерации [1].

Обеспечение стабильной экономической эффективности отрасли относится к первоочередным задачам.

В последние десятилетия актуальной проблемой современного виноградарства является повсеместно наблюдаемая тенденция постоянного прогрессирующего снижения жизнеспособности виноградных растений, сопровождаемого уменьшением их продуктивности, усилением интенсивности поражения

различными заболеваниями, в том числе болезнями древесины, а также преждевременной или внезапной их гибелью [2].

Болезни древесины винограда представляют собой группу заболеваний, вызываемых многими таксономически неродственными грибами (на сегодняшний день в мире выявлено более 280 видов грибов, относящихся более чем к 40 родам), которые живут и колонизируют древесину многолетних частей виноградного куста, вызывая ее некроз, обесцвечивание и белую гниль. Пораженные растения внешне проявляют прогрессирующее ухудшение состояния (задержка распускания почек, мертвые почки, отставание в развитии побегов, потеря продуктивности, апоплексия и т.д.), часто связанное с проявлением специфических (в зависимости от заболевания) симптомов на листьях. Более того, известно, что болезни древесины имеют непостоянную выраженность симптомов из года в год на отдельных виноградных растениях, при этом абиотические и биотические стрессы играют важную роль в их развитии [3–8].

Наблюдаемый в последние десятилетия в мире рост значимости болезней древесины винограда обусловлен следующими факторами. Во-первых, произошли радикальные изменения в технологиях выращивания – переход от традиционных формировок куста с низкой плотностью насаждений к узкорядным виноградникам, на которых обрезка зачастую проводится механическим способом, что способствует росту количества ран. Во-вторых, увеличение площадей виноградников, достигших возраста, когда симптомы начинают проявляться. И в-третьих, в начале 2000-х годов во многих странах было поэтапно прекращено использование арсенита натрия, фунгицидов на основе бензимидазола и бромистого метила из-за опасений экологического характера, что лишило отрасль самых эффективных химических препаратов против грибов-возбудителей болезней древесины. В тоже время общепризнано, что болезни древесины представляют собой одну из основных угроз будущей экономической устойчивости виноградарства, которая приводит к значительным экономическим потерям из-за снижения урожайности, увеличения затрат на возделывание, включая химические превентивные меры, а также сокращения продолжительности жизни виноградников [6, 9, 10].

В настоящее время к наиболее значимым болезням многолетней древесины винограда относят эску, эутипиоз, ботриосферное отмирание, черную пятнистость (эскориоз) и корневую гниль «чёрная ножка винограда». За последние несколько десятилетий частота симптомов этих заболеваний значительно увеличилась повсеместно [4, 11].

Эска считается одной из старейших болезней древесины винограда и широко распространена во всем мире. Согласно научным публикациям последних десятилетий данное заболевание отмечается на виноградниках Австралии [12], Франции [13], Испании [8], Португалии [7], Италии [14], Германии, Греции, Венгрии, Черногории, Бразилии [15], Румынии [4].

Калифорнии, США [16], Ливана [17], Китая [18], ЮАР [19], Чили [20]. Распространение эски также фиксируется на виноградниках Крыма и Краснодарского края [21–23]. Основные возбудители эски – аскомицеты *Phaeoconiella chlamydospora* и *Phaeoacromonium aleophilum*, базидиомицет *Fomitipiria mediterranea*. Развитие симптомов, связанных с эской, может быть двух типов: хроническое или острое. Внешние признаки характеризуются появлением на листьях светло-зеленых или хлоротических пятен между жилками, которые расширяются и сливаются, становятся все более некротическими и в конечном итоге приводят к образованию «тигровых полос» с узкой зеленой полосой вдоль средней жилки. Симптомы на ягодах проявляются в виде рассеянных или распределенных полосами мельчайших темно-коричневых или пурпурных пятен на кожице. На поперечных срезах хорошо различимы единичные или расположенные группами вокруг годичного кольца небольшие темные пятна, ближе к сердцевине обычно образуется мягкая гниль от белого до желтого цвета из которой обычно выделяют базидиомицеты. В середине лета, особенно когда за дождем следует сухая жаркая погода можно наблюдать такое явление, как апоплексия – отмирание одного или нескольких побегов, опадение листьев, сморщивание и засыхание гроздей [4, 24, 25].

Симптомы заболевания обычно являются результатом сложного взаимодействия различных факторов. Наиболее важными из них являются продуцируемые грибами вторичные метаболиты с фитотоксической активностью, которые перемещаются к листьям через ксилему. Специальными экспериментами показано, что при поражении эской изменение метаболизма растительных клеток происходит под влиянием выделяемых *Pa. chlamydospora* и *Pm. aleophilum* фитотоксинов, а также ферментов, разрушающих макромолекулы тканей растений винограда. Проявление лиственных симптомов (по сравнению с листьями бессимптомных растений) связано со снижением ассимиляции CO₂, общего содержания хлорофилла и др. Известны результаты исследований, когда изменение фотосинтетического аппарата (повреждение клеточных органелл, уменьшение количества и размеров крахмальных зерен) фиксировали за 2 месяца до проявления на листьях симптомов эски [11]. Мониторинг физиологического состояния растений винограда показал, что интенсивность сокодвижения у кустов с симптомами эски значительно снижалась за неделю до появления первых признаков болезни на листьях. В целом интенсивность сокодвижения у пораженных растений была примерно в два раза ниже, аналогичная тенденция отмечалась в отношении устьичной проводимости и интенсивности транспирации листьев [15]. Интересным моментом этиологии эски является то, что при необратимой деградации древесины (образование некрозов и мягкой гнили), проявление симптомов на листьях от года к году является не постоянным. Делается предположение, что каждый сезон новообразованные сосуды, перераспределяя сосудистую систему растения, могут

влиять на появление симптомов на листьях [25].

Ботриосферное отмирание также является широко распространенным заболеванием многолетней древесины во всех виноградарских регионах мира, в том числе Австралии и Новой Зеландии [26, 27], Испании [28], Португалии [9], Италии [10], Франции, Германии, Венгрии, Канаде, Мексике, Тунисе [15], Китае [29], США, Чили [30], Бразилии [31], ЮАР [19], Иране [32] и Ливане [17]. Заболевание, впервые описанное в 1974 г. в винодельческом районе Токай (Венгрия), изначально связывали с возбудителем *Diplodia mutila*. На сегодняшний день из 22 видов возбудителей ботриосферного отмирания наиболее распространены *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum luteum*, *Dothiorella viticola*, *Botryosphaeria dothidea*. Самые распространенные симптомы, связанные с этим заболеванием, следующие: по краям листьев с мая по июнь появляются желтовато-оранжевые (светло-ягодные сорта) или винно-красные (темно-ягодные сорта) пятна. В последующем эти пятна сливаются, образуя обширные зоны поражения между жилками и краями листа. Соцветия или грозди могут сморщиваться и засыхать. Одним из симптомов ботриосферного отмирания является развитие гнили ягод, которая играет важную роль в эпидемиологии болезни. В тяжелых случаях пораженные побеги полностью отмирают. Наличие на поперечных срезах пораженной древесины клиновидной многолетней язвы (неотличимая от таковой у эутипииоза) или пятна от кругового до неравномерного в центре является основным признаком заболевания [4, 33]. Наблюдаемые симптомы на листьях и ягодах могут быть вызваны внеклеточными соединениями, выделяемыми грибами. Для видов *Botryosphaeriaceae*, колонизирующих древесину виноградной лозы, показана способность продуцировать гидрофильные высокомолекулярные и липофильные низкомолекулярные фитотоксины [11, 34].

С 1970-х гг. грибок *Eutypa lata* идентифицировался как возбудитель эутипииоза в основных регионах производства винограда, включая Испанию [8], Португалию [7], Италию [10], Францию [35], Румынию [36], США [16], Венгрию, Канаду, Южную Африку [15], Ливан [17]. Возбудители эутипииоза: *Eutypa lata*, *Eutypella vitis*, *Eutypella microtheca*, *Eutypella citricola* и *Diatrypella vulgaris*. После инфицирования в результате обрезки и колонизации сосудистых тканей многолетней древесины обычно развивается коричневый клиновидный некроз. Внешние характерные симптомы эутипииоза в основном проявляются на виноградниках старше шести лет и наиболее заметны после распускания почек и включают развитие неполноценных побегов с укороченными междоузлиями, образование мелких, деформированных (чашевидных и рваных) хлоротичных листьев с краевым и межжилковым некрозом, а также развитие мелких и беспорядочных соцветий, часто большинство цветков засыхают не распустившись. Неполноценные побеги могут быть замаскированы развитием нормальных побегов, и к середине лета виноградные растения кажутся относительно здоровыми [4, 37]. Токсины, про-

дуцируемые *Eutypa lata* разрушают сосудистую ткань и подавляют транспорт питательных веществ, поэтому могут действовать как на стадии распускания почек, так и до нее, препятствуя нормальной вегетации виноградных растений [35]. Недавно было продемонстрировано, что полипептидное соединение, секретируемое *in vitro* культурами *E. lata*, действует на различные участки растительных клеток путем модификации потоков ионов и ингибирования Н⁺-АТФазы на плазмалемме за счет ингибирования дыхания и фотосинтеза [11].

Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что виноградные растения могут быть одновременно инфицированы несколькими фитопатогенными микромицетами, что в сочетании с их выделением из бессимптомных растений и непостоянным проявлением симптомов болезней древесины, а также отсутствием эффективных методов контроля делает эти заболевания чрезвычайно сложными для выявления и искоренения [4, 7, 9]. На сегодняшний день назрела острая необходимость в разработке новых методов обнаружения, идентификации и количественного определения, позволяющих легко и точно определять присутствие в растениях винограда возбудителей болезней древесины, а также без труда принимать фитосанитарные меры по предупреждению их развития, в том числе более строго контролировать производство посадочного материала в питомниках, ограничить перемещение инфицированных саженцев и таким образом избежать распространения инфекции в винодельческих регионах [38]. Многообещающим инструментом для исследования микробных сообществ, идентификации грибов-возбудителей болезней многолетней древесины винограда, а также исследования эпидемиологии и филогении в настоящее время является использование методов молекулярной биологии [7, 22, 23, 28].

Цель исследования – изучение распространения болезней многолетней древесины на виноградниках Крыма, особенностей их развития в зависимости от абиотических факторов, видовая диагностика возбудителей болезней многолетней древесины и разработка методов молекулярно-генетической идентификации. Знание о распространении болезней древесины винограда и основных факторов, связанных с их развитием, имеет важное значение для прогнозирования и эффективного контроля.

Материалы и методы исследования

Полевые исследования проводили в 2016–2022 гг. на виноградных насаждениях 30 предприятий в четырех основных виноградарских зонах Крыма: Южнобережной (ЮБК), Юго-западной (ЮЗК), Горно-долинной (ГДК) и Центральной степной (ЦСК) [39]. Маршрутные обследования, учеты и наблюдения выполняли с мая по сентябрь и приурочивали к основным фенологическим фазам развития винограда на насаждениях технических и столовых сортов типичных для зон исследования. При проведении исследований болезни древесины рассматривались в целом, без выделения конкретных заболеваний, учитывали

появление и развитие симптомов. Результаты наблюдений были обобщены, определена частота встречаемости изучаемых заболеваний в годы проведения исследований. Исследования выполнялись согласно общепринятым в отечественной и международной практике методическим подходам, адаптированным к виноградным агроценозам [40, 41].

Видовую диагностику возбудителей системных заболеваний винограда (болезни древесины) проводили в лаборатории защиты растений ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарач» РАН» и Биологической лаборатории НТЦ АО «Щелково Агрохим». Для выделения и идентификации грибов-возбудителей болезней винограда, изучения их морфолого-культуральных свойств использовали принятые в микробиологической практике методики закладки во влажную камеру, посева на питательные среды, а также споровые ловушки. Молекулярно-биологические методы диагностики основаны на технологии полимеразной цепной реакции (ПЦР), при которой увеличивается определенная часть таксономически значимого участка геномной ДНК интересующего возбудителя. Геномную ДНК из мицелия экстрагировали в соответствии с протоколом Lee & Taylor, 1988 [43]. Клеточные стенки грибного мицелия семидневного возраста разрушали путем измельчения в ступке. Затем добавляли буфер для экстракции СТАВ 2 % и после инкубации при 65 °С проводили очистку смесью фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) и осаждение изопропанолом. ДНК растворяли в 50 мкл ТЕ. Количество и чистота полученной ДНК определялась спектрофотометрически. Идентификацию грибов проводили с использованием разработок профильных институтов Франции, Испании, Италии и Южной Африки. Перед использованием все праймеры были проверены в поисковой компьютерной программе BLAST GenBank NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [44]. Полимеразная цепная реакция проводилась на четырехканальном программируемом амплификаторе ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ООО ДНК-Технология, г. Москва).

Результаты и их обсуждение

При проведении маршрутных обследований 2016–2022 гг. на насаждениях типичных технических и столовых сортов в основных виноградарских зонах Крыма ежегодно фиксировали случаи угнетенного развития, гибели как отдельных рукавов, так и виноградных кустов в целом. В весенний период наблюдали неравномерное распускание почек и рост побегов. Развивающиеся на побегах листья были мелкие, иногда чашевидной формы, характеризовались наличием хлоротичности, деформации и некрозов (такие симптомы наблюдаются при ботриесферном отмирании и эутипииозе). В течение сезона фиксировали развитие неполноценных побегов с хорошо выраженным короткоузием. На листьях отмечали появление по краю листовой пластинки желтых (светло-ягодные сорта) или красных (темно-ягодные сорта) пятен, в последующем сливающихся и образующих крупные межжилковые некрозы (обычно наблюдаемые при

ботриесферном отмирании) и образование пятен между жилками, которые сливались в хлоротичные и некротические полосы (тигровые) с узкой зеленой полосой вдоль средней жилки характерные для эски винограда [4, 24, 25, 33, 37]. На ягодах наблюдали характерную пятнистость. Обычно в середине лета фиксировали отмирание одного или нескольких побегов, целых рукавов, опадение листьев, сморщивание и засыхание гроздей. При осмотре поперечных срезов различных частей виноградного куста было установлено, что для 2–3-х летней древесины и рукавов характерно как круговое поражение тканей древесины, так и в виде v-образных секторов, наличие круговых точечных или штриховых темно-коричневых уплотнений. Некрозы составляли до 80 % и более площади поверхности поперечного среза; на рукавах и штамбах наблюдали круговой некроз на 70–100 % поверхности срезов и случаи разрушения сосудов ксилемы. Установленный в ходе обследований характер симптомов поражения виноградных кустов, в том числе многолетней древесины, свидетельствовал о том, что угнетенное состояние растений связано с разрушением проводящей системы патогенами грибной этиологии. Наиболее интенсивно болезнями древесины поражались технические сорта: Каберне Совиньон, Бастардо магарачский, Шардоне, Саперави, Траминер розовый, Кокур белый, Кефесия, Рислинг, Вердельо, Алиготе, Альбилио, Пино черный и серый, Ркацители; столовые сорта: Мускат Италия, Молдова, Кардинал, Мускат янтарный. Что касается влияния такого фактора, как возраст виноградных растений, то на виноградных насаждениях возрастом до 10 лет отмечали проявление симптомов поражения болезнями древесины на отдельных виноградных кустах, 10–15 лет – до 10–15 % кустов, а на участках в возрасте от 15 до 20 лет количество пораженных кустов достигало 25 %.

В целом по эпидемиологии (особенностям развития) болезней древесины на виноградниках Крыма можно говорить о проявлении двух типов их отрицательного влияния на растения винограда: первый – в самом начале вегетации; второй – в период активного роста и развития вегетативных, генеративных органов кустов винограда. В период проведения исследований неравномерное распускание почек, развитие неполноценных побегов с мелкими хлоротичными листьями обычно наблюдали в первой-второй декадах мая. Проявление на активно растущих растениях винограда самых первых симптомов (характерные хлоротичные пятна на листьях между жилками) фиксировали во второй-третьей декадах мая. Развитие типичных симптомов на листьях (краевые и межжилковые пятна желтого и красного цвета) различалось по годам исследований: так на фоне абиотического стресса (резкие колебания температур воздуха и режимов увлажнения) в 2017–2019, 2021 и 2022 гг. наблюдали, начиная с первой декады июня; в 2020 г. при умеренных температурах воздуха – с третьей декады июня. Максимальное проявление симптомов отмечали в июле-августе. Причем в 2017 и 2018 гг. в услови-

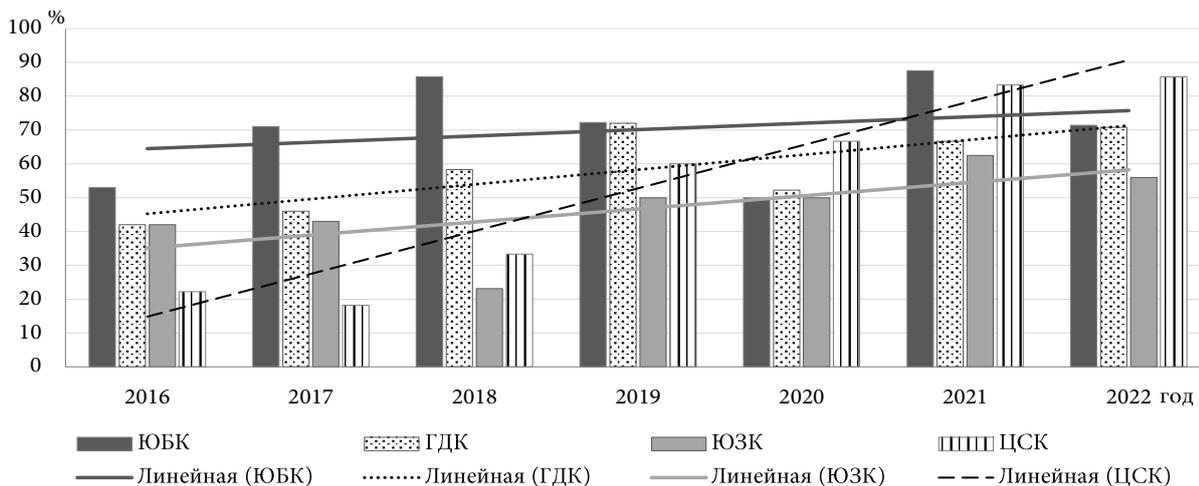


Рис. Основные тенденции изменения частоты встречаемости болезней древесины в ампелоценозах 4-х зон виноградарства Крыма (2016–2022 гг.)

Fig. Main tendencies in the frequency of trunk disease occurrence in ampelocenoses of 4 zones of Crimean viticulture (2016–2022)

ях повышенного температурного режима, почвенной и воздушной засухи во второй половине вегетации фиксировали более интенсивное проявление болезней древесины – отмирание нескольких побегов, целых рукавов или кустов, опадение листьев, сморщивание и засыхание гроздей.

В ходе анализа частоты встречаемости болезней древесины по основным зонам виноградарства Крыма в период проведения исследований (2016–2022 гг.) было установлено, что данный показатель варьировался от частого до повсеместного для Южного берега Крыма (50–87,5 %); был частым для Горно-долинного Крыма (42–72 %); на виноградниках Юго-западного и Центрального степного Крыма колебался от редкого до частого (23,1–62,5 %) и редкого до повсеместного (18,2–85,7 %) соответственно (рис.).

В целом, обобщение результатов исследований по определению частоты встречаемости и линии тренда свидетельствуют о прогрессирующем развитии в патоккомплексах ампелоценозов основных зон виноградарства Крыма комплексов грибов, поражающих проводящую систему виноградных растений и вызывающих болезни древесины (рис.). Наблюдаемые тенденции обусловлены прежде всего участвовавшими погодными стрессами (повышенный температурный режим, почвенная и воздушная засуха, резкие колебания температур воздуха и режимов увлажнения в течение вегетации), сортовым составом и возрастом виноградных насаждений. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в публикациях немецких, французских и румынских исследователей [4, 15, 44]. Например, полевыми наблюдениями, проведенными в 2015 и 2016 гг. на виноградниках в земле Рейнланд-Пфальц (юго-запад Германии), выявлен рост распространения болезней древесины, особенно для преобладающего в насаждениях сорта Рислинг, что связывают с влиянием условий окружающей среды, таких как смена прохладных и дождливых погодных условий на теплые и сухие, наблюдаемые в период проведения исследований [15]. Французские ученые в результате своих исследований также при-

ходили к выводу о том, что тенденции симптоматического проявления болезней древесины определяются такими факторами, как сорт, регион и год исследования [44]. В Румынии выделены следующие благоприятные факторы для развития эски: засуха, жара, мороз, относительная влажность воздуха более 25 %, оптимальные температуры 20–30 °С, а также сорт винограда (очень чувствительны Каберне Совиньон, Мускат Оттонель, Совиньон) [4].

В рамках исследований по видовой диагностике возбудителей болезней многолетней древесины в 2016 г. изучались образцы древесины рукавов виноградных кустов сорта Каберне Совиньон 2007 года посадки (г. п.) из Центрального степного Крыма с симптомами системных заболеваний, в том числе с поражением проводящих тканей. При детальном осмотре на коре и под корой многолетней древесины фиксировали наличие пикнидиальных образований шаровидной формы черного цвета. Изучение морфометрических характеристик, содержащихся в пикнидах пикноспор, показало принадлежность данных грибов к родам *Dothiorella* и *Diplodia*, также на поверхности коры отмечали развитие микромицетов, относящихся к *Hendersonia*. В период проведения исследований на споровые ловушки, установленные на участках сортов Мускат белый, Каберне Совиньон и Вердель (Южный берег Крыма), были отловлены пикноспоры микромицетов из родов *Hendersonia*, *Diplodia* и *Dothiorella*, относящихся к семейству *Botryosphaeriaceae*.

С целью более точного определения присутствия в растениях винограда возбудителей болезней древесины в рамках разработки новых методов их обнаружения, идентификации и количественного определения был использован молекулярно-биологический подход на основе ПЦР. Принцип метода заключается в многократном увеличении количества специфической ДНК, характерной только для искомого микромицета в результате ферментативной реакции полимеризации. Реакция контролируется олигонуклеотидами, фланкирующими видоспецифические участки

геномов каждого патогена. Для проведения данного исследования в 2021 г. с растений винограда с характерными симптомами были отобраны образцы многолетней древесины.

Диагностирование в тканях древесины винограда *Eutypa lata* (возбудителя эutipиоза) проводили ПЦР с праймерами, фланкирующими область внутренних транскрибируемых спейсерных последовательностей рибосомной ДНК данного аскомицета путем выделения ДНК из пораженной лозы [45]. Наличие *Eutypa lata* идентифицировали в образцах сортов Бастардо (2006 г. п.), Шардоне (2007 г. п.) и Ркацителли (2012 г. п.), произрастающих в Горно-долинной и Центрально-степной зонах виноградарства Крыма.

В связи с тем, что относящиеся к возбудителям эски виды *Phaeoacremonium* медленно растут на питательной среде и их трудно диагностировать на основе морфологических признаков, детекция рода в целом проводилась в ПЦР с помощью праймеров, специфичных ITS-региону его рДНК [46]. Видовая принадлежность уточнялась в реакции для диагностики *Phaeoacremonium minimum* (гетеротипический синоним *Phaeoacremonium aleophilum*) по протоколам сельскохозяйственной кафедры Флорентийского Университета [47]. Проверка показала следующие результаты: из тканей лозы винограда Шардоне (2007 г. п., Горно-долинный Крым) с признаками болезни древесины выделены грибы рода *Phaeoacremonium*. Видоспецифический ПЦР-тест на *P. aleophilum* не дал положительного результата. В настоящее время ведется работа по созданию тестов для диагностики еще тринадцати видов *Phaeoacremonium*, которые могут встречаться на виноградных лозах: *P. chlamydospora*, *P. parasiticum*, *P. viticola*, *P. angustius*, *P. inflatipes*, *P. mortoniae*, *P. australiense*, *P. krajdenii*, *P. scolyti*, *P. subulatum*, *P. venezuelense*, *P. austroafricanum* и *P. iranianum*.

При определении изолятов, выделенных из виноградной лозы сортов Ркацителли (2012 г. п.), Шардоне (2007 г. п.), Бастардо (2006 г. п.) и Бастардо магарачский (2006 г. п.), произрастающих в Центрально-степной, Горно-долинной и Юго-западной зонах виноградарства Крыма соответственно, на основе морфологических особенностей культуры идентифицировались как *Diaporthe* и были дополнительно аутентифицированы в ПЦР с видоспецифическими праймерами для генов, кодирующих белок бета-тубулина (*tub2*), как *Diaporthe ampelina* (син. *Phomopsis viticola*) – возбудитель черной пятнистости или эскориоза [48].

Таким образом, исследования по идентификации видов микромицетов как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами подтвердили поражение растений винограда системными заболеваниями ботриосферное отмирание, эска, эutipиоз и эскориоз (черная пятнистость).

Выводы

В результате проведенных исследований установлена этиология угнетения развития или гибели виноградных растений на насаждениях основных зон виноградарства Крыма. Исходя из характера симптомов поражения, результатов изучения морфометрических

параметров грибных структур и ДНК выделенных микромицетов, диагностировано их поражение комплексами грибов, вызывающих заболевания ботриосферное отмирание, эска, эutipиоз и черная пятнистость (эскориоз). Показано, что прогрессирующее увеличение интенсивности поражения проводящей системы виноградных растений болезнями древесины обусловлено, прежде всего, участвующими погодными стрессами (повышенный температурный режим, почвенная и воздушная засуха, резкие колебания температур воздуха и режимов увлажнения в течение вегетации), сортовым составом и возрастом виноградных насаждений.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № FEUU-2019-0011.

Financing source

The work was conducted under public assignment No. FEUU-2019-0011.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

1. Раджабов А.К., Мишуров Н.П., Щеголихина Т.А. Состояние и перспективы развития виноградарства, включая питомниководство: Научный аналитический обзор. М.: Российский научно-исследовательский институт информации и технико-экономических исследований по инженерно-техническому обеспечению агропромышленного комплекса. 2019:1-92.
2. Radzhabov A.K., Mishurov N.P., Shchegolikhina T.A. Status and prospects of development of viticulture, including nursery: Scientific analytical review. M.: Russian Research Institute of Information and Feasibility Studies for Engineering and Technical Support in the Agro-Industrial Complex. 2019:1-92 (in Russian).
3. Resolution OIV-VITI 653-2021. OIV definition of grapevine decline and recommendations for its mitigation. 2021:1-3.
4. Mondello V., Songy A., Battiston E., Pinto C., Coppin C., Trotel-Aziz P., Clément C., Mugnai L., Fontaine, F. Grapevine trunk diseases: A review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. Plant Disease. 2018;102(7):1189-1217. DOI 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE.
5. Muntean M.-D., Drăgulescu A.-M., Tomoiagă L.L., Comşa M., Răcoare H.-S., Sirbu A.D., Chedea V.S. Fungal grapevine trunk diseases in Romanian vineyards in the context of the international situation. Pathogens. 2022;11(9):1006. DOI 10.3390/pathogens11091006.
6. Hrycan J., Hart M., Bowen P., Forge T., Úrbez-Torres J. R. Grapevine trunk disease fungi: their roles as latent pathogens and stress factors that favour disease development and symptom expression. Phytopathologia Mediterranea. 2020;59(3):395-424. DOI 10.14601/Phyto-11275.
7. Gramaje D., Úrbez-Torres J. R., Mark R., Sosnowski M. R. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. Plant Disease. 2018;102(1):12-39. DOI 10.1094/PDIS-04-17-0512-FE.
8. Del Frari G., Gobbi A., Aggerbeck M.R., Oliveira H., Hansen L.H., Ferreira R.B. Characterization of the wood mycobiome of *Vitis vinifera* in a vineyard affected by esca. Spatial distribution of fungal communities and their putative relation

- with leaf symptoms. *Front. Plant Sci.* 2019;10:1-19. DOI 10.3389/fpls.2019.00910.
8. Cobos R., Ibañez A., Diez-Galán A., Calvo-Peña C., Ghorehshizadeh S., Coque, J.J.R. The grapevine microbiome to the rescue: Implications for the biocontrol of trunk diseases. *Plants.* 2022;11:840. DOI 10.3390/plants11070840.
9. Patanita M., Albuquerque A., Campos M.D., Materatski P., Varanda C.M.R., Ribeiro J.A., Félix M.d.R. Metagenomic assessment unravels fungal microbiota associated to grapevine trunk diseases. *Horticulturae.* 2022;8(4):288. DOI 10.3390/horticulturae8040288.
10. Rosace M. Ch., Legler S. E., Salotti I., Rossi V. Susceptibility of pruning wounds to grapevine trunk diseases: A quantitative analysis of literature data. *Frontiers in Plant Science Front. Plant Sci.* 2023;14:1-17. DOI 10.3389/fpls.2023.1063932.
11. Bertsch C., Ramírez-Suero M., Magnin-Robert, M., Larignon, P., Chong, J., Abou-Mansour, E., Spagnolo, A., Clément, C. and Fontaine, F. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology.* 2013;62:243-265. DOI 10.1111/j.1365-3059.2012.02674.x.
12. Edwards J., Pascoe I.G. Occurrence of *phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. *Australasian Plant Pathology.* 2004;33:273-279. DOI 10.1071/AP04016.
13. Lecomte P., Diarra B., Carboneau A., Rey P., Chevrier C. Esca of grapevine and training practices in France: results of a 10-year survey. *Phytopathologia Mediterranea.* 2018;57(3):472-487. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-22025.
14. Pacetti A., Moretti S., Pinto C., Compant S., Farine S., Bertsch C., Mugnai L. Trunk surgery as a tool to reduce foliar symptoms in diseases of the esca complex and its influence on vine wood microbiota. *Journal of Fungi.* 2021;7(7):521. DOI 10.3390/jof7070521.
15. Goddard M.L. Abstracts of oral and poster presentations given at the 10th International Workshop on Grapevine Trunk Diseases, Reims, France, 4-7 July 2017. *Phytopathologia Mediterranea.* 2017;56(3):513-588. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-21865.
16. Brown A.A., Travadon R., Lawrence D.P., Torres G., Zhuang G., Baumgartner K. Pruning-wound protectants for trunk-disease management in California table grapes. *Crop Protection.* 2020;141:105490. DOI 10.1016/j.cropro.2020.105490.
17. Elia C., Jreijiri F., Paulette C., Valerie M., Gwenaelle C., Jean-Michel L., Mostert L., Michael F., Pascal L. Fungal community associated with grapevine wood lesions in Lebanon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.* 2014; 48:293-302. DOI 10.20870/oeno-one.2014.48.4.1696.
18. Ye Q.T., Manawasinghe I.S., Zhang W., Mugnai L., Hyde K.D., Li X.H., Yan J.Y. First report of *Phaeoacremonium minimum* associated with grapevine trunk diseases in China. *Plant Disease.* 2020;104(4):1259-1259. DOI 10.1094/PDIS-08-19-1649-PDN.
19. Halleen F., Fourie P.H. An integrated strategy for the proactive management of grapevine trunk disease pathogen infections in grapevine nurseries. *South African Journal of Enology and Viticulture.* 2016;37(2):104-114. DOI 10.21548/37-2-825.
20. Besoain X. Grapevine Trunk Diseases (GTDs): Impact on table grapes and wine vineyards in Chile. *Grapes and Wines – advances in production, processing, analysis and valorization.* 2018:43-58. DOI 10.5772/intechopen.72607.
21. Алейникова Н.В., Галкина Е.С., Радионовская Я.Э. Болезни и вредители виноградной лозы. Санкт-Петербург. 2018:1-152.
- Aleinikova N.V., Galkina Ye.S., Radionovskaya Ya.E. Diseases and pests of the vine. Saint Petersburg. 2018:1-152.
- (in Russian).
22. Володин В.А., Странишевская Е.П., Гориславец С.М., Шадур Н.И., Рисованная В.И. Тестирование фитопатогена *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2020;22(1):52-55. DOI 10.35547/IM.2020.22.1.011.
- Volodin V.A., Stranishevskaya E.P., Gorislavets S.M., Shadura N.I., Risovannaya V.I. Testing the phytopathogen *Phaeoacremonium minimum* in perennial grape wood. *Magarach. Viticulture and Winemaking.* 2020;22(1):52-55. DOI 10.35547/IM.2020.22.1.011 (in Russian).
23. Блинова С.А., Шварцев А.А., Странишевская Е.П., Володин В.А., Ильницкая Е.Т., Макаркина М.В., Алексеев Я.И. Изучение распространения и генетического разнообразия *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium aleophilum* на территории виноградных насаждений Краснодарского края и Крыма // Системная Биология и Биоинформатика (SBB-2020). Тезисы докладов 12-ой школы молодых ученых. Новосибирск. 2020:64. DOI 10.18699/SBB-2020-48.
- Blinova S.A., Shvartsev A.A., Stranishevskaya E.P., Volodin V.A., Ilnitskaya E.T., Makarkina M.V., Alekseev Ya.I. Study of distribution and genetic diversity of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in the vineyards of the Krasnodar Territory and Crimea. *System Biology and Bioinformatics (SBB-2020). Abstracts of the 12th school of young scientists.*2020:64. DOI 10.18699/SBB-2020-48 (in Russian).
24. *Phaeoacremonium minimum* (Petri disease). *PlantwisePlus Knowledge Bank.* 2022. DOI 10.1079/pwkb.species.39961.
25. Lecomte P., Darrieutort G., Liminana J.-M., Comont G., Muruamendiaraz A., Legorburu F.-J., Choueiri E., Jreijiri F., El Amil R., Fermaud M. New insights into esca of grapevine: The development of foliar symptoms and their association with xylem discoloration. *Plant Dis.* 2012;96:924-934.
26. Billones-Baaijens R., Savocchia S. A review of *Botryosphaeriaceae* species associated with grapevine trunk diseases in Australia and New Zealand. *Australasian Plant Pathol.* 2019;48:3-18. DOI 10.1007/s13313-018-0585-5.
27. Amponsah N.T., Jones E.E., Ridgway H.J., Jaspers M.V. Identification, potential inoculum sources and pathogenicity of *botryosphaeriaceous* species associated with grapevine dieback disease in New Zealand. *Eur J Plant Pathol.* 2011;131:467-482. DOI 10.1007/s10658-011-9823-1.
28. Martín M.T., Cuesta M.J., Martín L. Development of SCAR primers for PCR assay to detect *Diplodia seriata*. *International Scholarly Research Notices.* 2014;824106:1-9. DOI 10.1155/2014/824106.
29. Zhang W., Liu A., Zhang X., Yan H., Liu R., Pang G., Huang J., Li X., Yan J. Construction and evaluation of a transformant library of *Lasiodiplodia theobromae* generated through restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathologia Mediterranea.* 2014;53(3):451-458. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-12692.
30. Silva-Valderrama I., Toapanta D., Miccono M.A., Lolas M., Díaz G.A., Cantu D., Castro A. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. *Front. Microbiol.* 2021;11:614620. DOI 10.3389/fmicb.2020.614620.
31. Correia K.C., Silva M.A., de Morais M.A., Armengol J., Phillips A.J.L., Câmara M.P.S., Michereff S.J. Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathol.* 2016;65:92-103. DOI 10.1111/ppa.12388.
32. Mohammadi H., Gramaje D., Banihashemi Z., Armengo J. Characterization of *Diplodia seriata* and *Neofusicoccum parvum* associated with grapevine decline in Iran. *Journal of Agri-*

- cultural Science and Technology. 2013;15:603-616.
33. Reeder R. *Diplodia seriata* (grapevine trunk disease). CABI International. 2022. DOI 10.1079/cabicompendium.9630.
 34. Cobos R., Calvo-Peña C., Álvarez-Pérez J.M., Ibáñez A., Diez-Galán A., González-García S., García-Angulo P., Acebes J.L., Coque J.J.R. Necrotic and Cytolytic Activity on grapevine leaves produced by Nep1-like proteins of *Diplodia seriata*. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1-13. DOI 10.3389/fpls.2019.01282.
 35. Guerin-Dubrana L., Labenne A., Labrousse J.C., Bastien S., Rey P., Gégout-Petit A. Statistical analysis of grapevine mortality associated with esca or Eutypa dieback foliar expression. *Phytopathologia Mediterranea*. 2012;52(2):276-288.
 36. Comşa M., Tomoiagă L.L., Botea V., Sirbu A.L., Dobromir D., Vasiu I., Chedea V.S. Identification by plate culture method of the fungal pathogens causing the grapevine trunk diseases in Romanian vineyards. *Romanian Journal of Horticulture*. 2021;2:137-142. DOI 10.51258/RJH.2021.18.
 37. Eutypa lata (Eutypa dieback). PlantwisePlus Knowledge Bank. CABI International. 2020. DOI 10.1079/pwkb.species.23591.
 38. Azevedo-Nogueira F., Rego C., Gonçalves H.M.R., Fortes A.M., Gramaje D., Martins-Lopes P. The road to molecular identification and detection of fungal grapevine trunk diseases. *Frontiers in Plant Science*. 2022;13:960289. DOI 10.3389/fpls.2022.960289.
 39. Виноградний кадастр України. Міністерство аграрної політики, УААН, Центрдержродючість. <http://eurowine.com.ua/tmp/kadastr/index.php> (дата обращения 04.05.2023).
 - Grape cadastre of Ukraine. Ministry of Agrarian Policy, UAAS, Center for Regional Development. <http://eurowine.com.ua/tmp/kadastr/index.php> (date of access 04.05.2023).
 40. Якушина Н.А., Странишевская Е.П., Радионовская Я.Э., Цибульняк Ю.А., Хижняк Ю.Е. Методические рекомендации по применению фитосанитарного контроля в защите промышленных виноградных насаждений юга Украины от вредителей и болезней. Симферополь: Полипресс. 2006:1-24.
 - Yakushina N.A., Stranishevskaya E.P., Radionovskaya Ya.E., Tsi-bulnyak Yu.A., Khizhnyak Yu.E. Guidelines for the use of phytosanitary control in the protection of industrial vineyards in the South of Ukraine from pests and diseases. Simferopol: Poly-press. 2006:1-24 (in Russian).
 41. Карпун Н. Н. Структура комплексов вредных организмов древесных растений во влажных субтропиках России и биологическое обоснование мер защиты: специальность 06.01.07 «Защита растений»: диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. Москва. 2018:1-399.
 - Karpun N.N. Structure of harmful organism complexes on wood plants in the humid subtropics of Russia and biological substantiation of protection measures: specialty 06.01.07 "Protection of plants": dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences. Moscow. 2018:1-399 (in Russian).
 42. Lee S. B., Milgroom M.G., Taylor J.W. A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Fungal Genetics Reports*. 1988;35(11).
 43. MycoBank Database. <http://www.mycobank.org/> (дата обращения 04.05.2023).
 - MycoBank Database. <http://www.mycobank.org/> (date of access 04.05.2023).
 44. Bruez E., Lecomte P., Grosman J., Doublet B., Bertsch C., Fontaine F., Ugaglia A., Teissedre P.-L., Da Costa J.-P., Guerin-Dubrana L., Rey P. Overview of grapevine trunk diseases in France in the 2000s. *Phytopathologia Mediterranea*. 2012;52(2):262-275. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-11578.
 45. Lecomte P., Péros J.P., Blancard D., Bastien N., Délye C. PCR assays that identify the grapevine dieback fungus *Eutypa lata*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(10):4475-4480. DOI 10.1128/AEM.66.10.4475-4480.2000.
 46. Aroca A., Raposo R. PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(9):2911-2918. DOI 10.1128/AEM.02176-06.
 47. Tegli S., Bertelli E., Surico G. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamyosporum* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea*. 2000;39(1):134-149. DOI 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1555.
 48. Lesuthu P., Mostert L., Spies C.F.J., Moyo P., Regnier T., Halleen F. *Diaporthebulae* sp. nov. and first report of *D. cynaroidis*, *D. novem*, and *D. serafinae* on grapevines in South Africa. *Plant Disease*. 2019;103(5):808-817. DOI 10.1094/PDIS-03-18-0433-RE.

Информация об авторах

Евгения Спиридоновна Галкина, канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: galkinavine@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4322-4074>;

Наталья Васильевна Алейникова, д-р с.-х. наук, заведующая лабораторией защиты растений; e-мэйл: aleynikova@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1167-6076>;

Яна Эдуардовна Радионовская, канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: vovkayalta@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9124-8436>;

Елена Александровна Болотянская, науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: saklina@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2218-8019>;

Сергей Юрьевич Белаш, мл. науч. сотр. лаборатории защиты растений; e-мэйл: mithr2441@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7422-6588>;

Наталья Викторовна Аршава, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела биологических исследований; e-мэйл: narshava222@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2102-4621>;

Кира Николаевна Божко, канд. биол. наук, начальник отдела биологических исследований; e-мэйл: kira_bozhko@mail.ru;

Салис Добаевич Каракотов, д-р хим. наук, академик РАН, генеральный директор; e-мэйл: info@betaren.ru.

Information about authors

Yevgenia S. Galkina, Cand. Agric. Sci., Senior Staff Scientist, Leading Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: galkinavine@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4322-4074>;

Natalia V. Aleinikova, Dr. Agric. Sci., Deputy Director for Science, Chief Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: aleynikova@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1167-6076>;

Yana E. Radionovskaya, Cand. Agric. Sci., Leading Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: vovkayalta@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9124-8436>;

Elena A. Bolotianskaia, Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: saklina@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2218-8019>;

Sergey Yu. Belash, Junior Staff Scientist, Laboratory of Plant Protection; e-mail: mithr2441@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7422-6588>;

Natalia V. Arshava, Cand. Biol. Sci., Senior Staff Scientist, Dept. of Biological Research; e-mail: narshava222@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2102-4621>;

Kira N. Bozhko, Cand. Biol. Sci., Head of the Dept. of Biological Research; e-mail: kira_bozhko@mail.ru;

Salis D. Karakotov, Dr. Chem. Sci., Academician of the RAS, General Director; e-mail: info@betaren.ru.

Статья поступила в редакцию 16.05.2023, одобрена после рецензии 22.05.2023, принята к публикации 25.05.2023.