

Тестирование фитопатогена *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда

Виталий Александрович Володин, канд. с.-х. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований, mgr.magarach@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2842-6092>;

Елена Павловна Странишевская, д-р с.-х. наук, профессор, зав. лабораторией органического виноградарства, stranishevskayaelena@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-2840-5638>;

Светлана Михайловна Гориславец, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований, mgr.magarach@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-6749-8048>;

Надежда Ивановна Шадура, канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр. лаборатории органического виноградарства, shadura-82@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8365-0521>;

Валентина Ивановна Рисованная, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., mgr.magarach@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-2208-798X>

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН», Россия, Республика Крым, 298600, г. Ялта, ул. Кирова, 31.

Эска является одним из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний многолетней древесины во всех виноградарских регионах мира. В зависимости от почвенно-климатических условий и сортового состава уровень распространения эски может составлять до 50% и более. Одним из возбудителей эски является гриб *Phaeoacremonium minimum*, который вызывает трахеомикоз сосудистой системы растения винограда, приводящий к гибели всего растения. Традиционные микробиологические методы идентификации *Phaeoacremonium minimum* трудоемки и могут давать ложноотрицательные результаты при низких уровнях инфекции. Одним из наиболее эффективных и чувствительных инструментов диагностики грибных фитопатогенов в растениях является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Цель исследования заключалась в тестировании *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда методом ПЦР. Выделение геномной ДНК проводили методом СТАВ. С целью уменьшения побочных продуктов и увеличения выхода целевых фрагментов выполняли гнездовую ПЦР (nested PCR). В результате тестирования возбудитель *Phaeoacremonium minimum* был выявлен в штамбах и рукавах растений винограда как с наличием визуальных признаков эски, так и внешне бессимптомных. В результате выполненного исследования оптимизированы некоторые методические аспекты тестирования *Phaeoacremonium minimum*.

Ключевые слова *Phaeoacremonium minimum*; эска; виноград; многолетняя древесина винограда; полимеразная цепная реакция.

Введение. Виноградарство является ключевой отраслью сельского хозяйства Крыма. Площадь насаждений на 2019 г. составляет 18,9 тыс. га [1]. В возрастной

Как цитировать эту статью:

Володин В.А., Странишевская Е.П., Гориславец С.М., Шадура Н.И., Рисованная В.И. Тестирование фитопатогена *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда // «Магарач». Виноградарство и виноделие, 2020; 22(1); С. 52-55. DOI 10.35547/IM.2020.22.1.011

How to cite this article:

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)

УДК 635.21:632.4:631.524:577.21

Поступила 31.01.2020

Принята к публикации 17.02.2020

© Авторы

ORIGINAL RESEARCH

Testing the phytopathogen *Phaeoacremonium minimum* in perennial grape wood

Vitalii Aleksandrovich Volodin, Elena Pavlovna Stranishevskaya, Svetlana Mikhailovna Gorislavets, Nadezhda Ivanovna Shadura, Valentina Ivanovna Risovannaya

Federal State Budget Scientific Institution All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, 31 Kirova str., 298600 Yalta, Republic of Crimea, Russian Federation

Esca is one of the most widespread and harmful diseases of perennial wood in all viticulture regions of the world. Depending on the soil and climatic conditions and varietal composition, the level distribution of esca can be up to 50% or more. One of the causative agents of esca is the *Phaeoacremonium minimum* fungus, which causes tracheomycosis of the vascular system of the grape plant, resulting in the death of the entire plant. Conventional microbiological identification methods for *Phaeoacremonium minimum* are laborious and can give false negative results at low levels of infection. One of the most effective and sensitive diagnostic tools for fungal plant pathogens in plants is the polymerase chain reaction (PCR) method. The aim of our study was to test the *Phaeoacremonium minimum* in perennial grape wood by PCR. Genomic DNA was isolated by the CTAB method. In order to reduce by-products and increase the yield of target fragments, nested PCR was performed. As a result of testing, the pathogen *Phaeoacremonium minimum* was detected in the trunks and arms of grape plants, both with the presence of visual signs of esca or externally asymptomatic. As a result of the study, some methodological aspects of testing the *Phaeoacremonium minimum* were optimized.

Key words: *Phaeoacremonium minimum*; esca; grape; perennial grape wood; polymerase chain reaction.

структуре преобладают насаждения со сроком эксплуатации 11-47 лет. Увеличение срока эксплуатации виноградных насаждений, низкий уровень агротехники и системы защиты привело к тому, что на виноградных насаждениях, кроме сезонных микозов, накапливаются и распространяются такие болезни многолетней древесины винограда как эска, эутипиоз и усыхание рукавов [2,3].

Эска является одним из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний многолетней древесины во всех виноградарских регионах мира. В зависимости от почвенно-климатических условий и сортового состава насаждений уровень распространения эски может составлять до 50% и более [4].

Широкие исследования этиологии эски начались в конце XIX века в связи с её распространением в основных ви-

ноградских районах США, Европы, особенно во Франции, Германии, Италии, Греции, Португалии. Из многолетней древесины, пораженной эской были выделены фитопатогены различной этиологии. Это способствовало возникновению гипотезы о том, что возбудителем эски является комплекс грибов и бактерий [5]. Также была выдвинута гипотеза, что кроме фитопатогенов, причина возникновения эски может заключаться в нарушении физиологии растения под влиянием почвенно-климатических факторов, но впоследствии эта гипотеза была отвергнута [6,7,8].

Проведенные в конце XX века исследования с применением молекулярно-генетических методов позволили идентифицировать возбудителей эски. Таким образом, с эской ассоциируются фитопатогены грибной этиологии *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium minimum* и *Fomitiporia mediterranea* [9].

Грибы *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium minimum* вызывают трахеомикоз сосудистой системы растения винограда. [10,11]. В ксилеме многолетней древесины винограда мицелий *Phaeomoniella chlamydospora* и *Phaeoacremonium minimum* движется вверх, а иногда в соседние сосуды и клетки паренхимы. Как следствие, происходит закупоривание сосудистой системы многолетней древесины винограда. Визуально это проявляется в виде изменения окраски ксилемы многолетней древесины от темно-коричневой до черной. Также происходит продольное и поверхностное обесцвечивание молодых древесных сосудов, расположенных чуть глубже коры, которые легко видны в вегетационный период при её отслаивании.

Другой возбудитель эски, базидиомицет, *Fomitiporia mediterranea*, вызывает гниение древесины, которое проявляется в виде белой гнили пораженных штабмов и рукавов (Fischer, 2006). [12].

Заболевание эски может протекать в двух формах. Первая форма характеризуется интенсивным развитием эски и приводит к внезапному усыханию всего растения. Вторая форма характеризуется постепенным усыханием различных частей куста в течении нескольких лет, вызванным токсинами грибкового происхождения [13].

Визуальным симптомом эски на листьях является изменение окраски листовой пластины вдоль главных жилок, которое приводит к некротизации и деформации, при этом главные жилки остаются зелеными. Плодовые лозы, пораженные эской усыхают, ягоды горошатся, грозди усыхают. Было установлено, что на проявление визуальных симптомов и интенсивность развития эски могут влиять восприимчивость сорта, возраст виноградных лоз, а также погодные условия [14].

Источниками распространения инфекции является растительный сок пораженного растения, а также почва вблизи пораженного растения. Растениями-резервуарами могут служить олива европейская (*Olea europaea*), киви (*Actinidia deliciosa*) и вьюнок полевой (*Convolvulus arvensis*) [3].

Запрет в начале 2000 гг. на применение арсени-

та нартия на виноградных насаждениях для борьбы с эской послужил причиной широкого распространения данного заболевания во всех виноградарских регионах мира, включая Калифорнию, Португалию, Францию, Испанию, Австралию, Грецию, Новую Зеландию и Южную Африку [4,8].

В связи с высокой интенсивностью распространения и вредоносностью эски, существует необходимость в отработке методов диагностики возбудителей микозов. Традиционные микробиологические методы идентификации не только трудоемки и занимают много времени, но и могут давать ложноотрицательные результаты при низких уровнях инфекции. Другие грибы, которые выделены вместе с *Phaeoacremonium minimum*, могут расти более интенсивно, что затрудняет идентификацию *Phaeoacremonium minimum* [15].

Наиболее эффективным инструментом диагностики наличия фитопатогенов в растениях является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) [16,17].

Цель исследования заключалась в тестировании *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда методом ПЦР.

Материалы и методы исследований. Исследования выполнены на насаждениях сортов винограда Асма, Бастардо магарачский и Каберне Совиньон. Срок эксплуатации обследованных виноградных насаждений 10 и более лет. Сроки проведения обследований – май и август. Маршрут обследования виноградных насаждений проводили согласно «Методическим рекомендациям по применению фитосанитарного контроля в защите промышленных виноградных насаждений юга Украины от вредителей и болезней» [20]. Наличие визуальных признаков заболевания и характеристику их как симптомов эски проводили методом визуальной критической оценки.

С растений винограда, имеющих визуальные симптомы, а также с бессимптомных растений были отобраны фрагменты многолетней древесины и помещены в отдельные сейф-пакеты для последующей ПЦР-диагностики на наличие *Phaeoacremonium minimum* в ксилеме многолетней древесины.

С целью удаления вторичных метаболитов из многолетней древесины выделение геномной ДНК выполняли методом СТАВ [18] с нашими модификациями. Чистоту и количество экстрагированной ДНК оценивали по коэффициенту абсорбции на спектрофотометре "Biorhotometer plus" и методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Амплификацию выполняли на приборе T-100 Bio-Rad согласно рекомендациям White et al. 1990 [19].

Результаты и их обсуждение. В результате маршрутных обследований были отмечены некоторые растения с признаками отставание в росте, усыхание плодовых лоз и рукавов, горошение ягод и усыхание гроздей. Кроме этого выявлены характерные симптомы такие как изменение окраски листовой пластины между главными жилками, при этом главные жилки оставались зелеными, а также некротизация и деформация

листьев. При поперечном разрезе штамба или рукава невооруженным глазом видны некротические пятна. Из отобранных фрагментов многолетней древесины как с парожженных, так и с бессимптомных растений методом СТАВ была экстрагирована ДНК. Показатели чистоты ДНК находились в пределах 1,6–2,0. Количество и чистота выделенной ДНК были достаточными для выполнения ПЦР, которая включала 2 этапа (ПЦР1 и ПЦР2).

Первый этап ПЦР (ПЦР 1) выполнен со специфическими праймерами ITS1, ITS5. В целях уменьшения побочных продуктов амплификации экспериментальным путём нами были подобраны следующие параметры для ПЦР 1:

- 1 - начальная денатурация при +95°C в течение 3 мин.;
- 2 - 37 циклов, каждый цикл по 30 с при +95°C;
- 3 - 30 с при +60°C;
- 4 - 45 с при +72°C;
- 5 - 5 мин. - финальная элонгация при +72°C.

Для второго этапа (ПЦР 2) использовали ПЦР-продукты, полученные при выполнении ПЦР 1, которые были разведены в соотношении 1:100. Амплификация выполнена со специфическими праймерами PmF и PmR. В целях повышения специфичности реакции ПЦР 2 подобраны следующие параметры амплификации:

- 1 - начальная денатурация при +95°C в течение 3 мин.;
- 2 - 36 циклов по 30 с при +95°C;
- 3 - 30 с при +63°C;
- 4 - 45 с при 72°C;
- 5 - 5 мин. - финальная элонгация при +72°C.

ПЦР-продукты после первой и второй амплификации (ПЦР 1 и ПЦР 2) были проанализированы методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле (рис.).

В результате визуализации методом гель-электрофореза идентифицированы ПЦР 2 фрагменты с молекулярной массой 400 п.н.

Также были амплифицированы нецелевые фрагменты с молекулярной массой 200 п.н.

В результате ПЦР-диагностики в штамбах и рукавах анализируемых растений винограда как с наличием визуальных признаков эски, так и бессимптомных был выявлен *Phaeoacremonium minimum*.

Выводы

Подтверждено, что метод ПЦР является эффективным инструментом для диагностики *Phaeoacremonium minimum* в многолетней древесине винограда. Оптимизированы методические аспекты проведения амплификации. *Phaeoacremonium minimum* был выявлен в штамбах, рукавах пораженных растений винограда.

Источники финансирования

Не указан.

Financing source

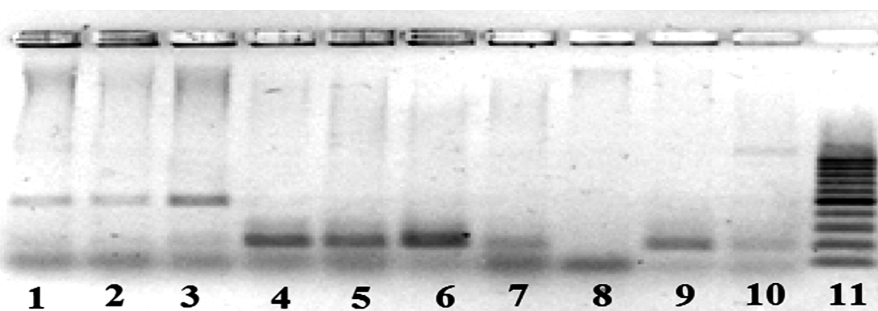


Рис. Фрагмент электрофореграммы. Лунка 11 – маркер молекулярного веса, 100 п.н.; 1,2,3 – фрагмент фореграммы ПЦР 2 – ампликоны *Phaeoacremonium minimum*
Fig. A fragment of an electrophoregram. Well 11 - molecular weight marker, 100 bp; 1,2,3 - a fragment of PCR 2 phoregram - amplicons *Phaeoacremonium minimum*.

Not specified.

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests:

Not declared.

Список литературы/References

1. <https://rk.gov.ru/uploads/msh/attachments/documents/d4/1d/8c/d98f00b204e9800998ecf8427e/5c6e56275bc0c1.97787061.pdf?1.0.413>.
2. Gramaje D, Armengol J (2011) Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. *Plant Dis* 95:1040–1055
3. Gramaje, D., Úrbez-Torres, J. R., and Sosnowski, M. R. (2018). Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: current strategies and future prospects. *Plant Dis.* 102, pp. 12–39. doi: 10.1094/
4. Surico G., 2009. Towards a redefinition of the diseases within the esca complex of grapevine. *Phytopathologia Mediterranea* 48, pp. 5–10.
5. Halleen F., P. W. Crous and O. Petrini. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australas.* 2003. *Plant Pathol.* 32:47–52.
6. Larignon P. and B. Dubos, 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 103, pp. 147–157. Surico G., L. Mugnai and G. Marchi, 2006.
7. Older and more recent observations on esca: a critical overview. *Phytopathologia Mediterranea* 45, pp. 68–86.
8. Laveau C., A. Letouze, G. Louvet, S. Bastien, and L. Guerin-Dubrana, 2009. Differential aggressiveness of fungi implicated in esca and associated diseases of grapevine in France. *Phytopathologia Mediterranea* 48, pp. 32–46.
9. Gramaje D, Armengol J, Mohemmadi H, Banihashemi Z, Mostert L (2009) Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. *Mycol* 101:920–929.
10. Tegli S., E. Bertelli and G. Surico, 2000. Sequence analysis of ITS ribosomal DNA in five *Phaeoacremonium* species and development of a PCR-based assay for the detection of *P. chlamydospora* and *P. aleophilum* in grapevine tissue. *Phytopathologia Mediterranea* 39, pp. 134–149.
11. Mondello, V., Songy, A., Battiston, E., Pinto, C., Coppin, C., Trotel-Aziz, P., et al. (2017). Grapevine trunk diseases: a review of fifteen years of trials for their control with chemicals and biocontrol agents. *Plant Dis.* 102, pp. 1189–1217. doi: 10.1094/PDIS-08-17-1181-FE
12. Fischer M., 2006. Biodiversity and geographic distribution of basidiomycetes causing esca-associated white rot in

- grapevine: a worldwide perspective. *Phytopathologia Mediterranea* 45, pp. 30–42.
13. Lorrain B., Ky I., Pasquier G., Jourdes M., Guerin-Dubrana L., Gény L., Rey P., Donèche B., Teissedre P.L. (2012) Effect of Esca disease on the phenolic and sensory attributes of cabernet sauvignon grapes, musts and wines. *Aust J Grape Wine Res* 18:64–72.
 14. Gubler W. D., Rolshausen P. E., Trouillas F. P., Úrbez-Torres J. R., Voegal T., Leavitt G. M., et al. (2005). Grapevine trunk diseases in California. *Pract. Winery Vineyard* pp. 1–9.
 15. Aroca A., R. Raposo and P. Lunello, 2008. A biomarker for the identification of four *Phaeoacremonium* species using the β -tubulin gene as the target sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, pp. 1131–1140.
 16. Aroca A., Raposo R. (2007) PCR-based strategy to detect and identify species of *Phaeoacremonium* causing grapevine diseases. *Appl Environ Microb* 73:2911–2918
 17. Essakhi S., L. Mugnai, P.W. Crous, J.Z. Groenewald and G. Surico, 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. *Persoonia* 21, pp. 119–134.
 18. Lee S. and J. Taylor, 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White, ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 282–287.
 19. Ridgway H. J., B. E. Sleight, and A. Stewart. 2002. Molecular evidence for the presence of *Phaeoacremonium chlamydospora* in New Zealand nurseries, and its detection in rootstock mother vines using species-specific PCR. *Australas. Plant Pathol.* 31:267-271.
 20. Н.А. Якушина и др. Методические рекомендации по применению фитосанитарного контроля в защите промышленных виноградных насаждений юга Украины от вредителей и болезней / Симферополь: Полипресс, 2006. – 24 с. N. A. Yakushina. Methodological recommendations on the application of phytosanitary control in the protection of industrial grape plantations in the South of Ukraine from pests and diseases. Simferopol: Polipress, 2006. 24 p. (*in Russian*)