

УДК 634.8:576.858:632

**ПОЧЕРНЕНИЕ ДРЕВЕСИНЫ – ФИТОПЛАЗМЕННОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ
ВИНОГРАДА В РЕСПУБЛИКЕ МОЛДОВА**

**“BOIS NOIR” – GRAPEVINE PHYTOPLASMA DISEASE
IN REPUBLIC OF MOLDOVA**

*Е.И. Хаустов, М.В. Дубчак
В.В. Бондарчук*

Научно-Практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий, Кишинёв, Республика Молдова,
e-mail: vbondv2000@gmail.com

*E.I. Haustov, M.V. Dubchak
V.V. Bondarchuk*

Scientific and Practical Institute of Horticulture, Viticulture and Food Technology, Chisinau, Republic of Moldova, e-mail: vbondv2000@gmail.com

Аннотация. За последние десятилетия фитоплазменные заболевания с эпифитотическим характером – Золотистое пожелтение и Почернение древесины выявлены во многих виноградовинодельческих странах. В Республике Молдова, с 2017 по 2019 гг. проведены обследования производственных насаждений винограда во всех зонах возделывания, на площади более 1500 га. Симптомы заболевания фитоплазменной этиологии обнаружены на всех европейских, автохтонных и новой селекции сортах винограда. В период визуального мониторинга проведён отбор 270 проб виноградной лозы для анализа ПЦР. В результате диагностики идентифицирован возбудитель фито-плазменного заболевания, относящийся к подгруппе столбура – Почернение древесины. Ни в одной из проб не обнаружен карантинный объект – Золотистое пожелтение. Мониторинг и идентификация цикад проведены на плантациях винограда и прилегающих территориях, в результате выявлены *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus panzeri*, *Scaphoideus titanus*. *Dictyophara europaea*, *Philaenus spumarius*, *Javesella pellucida*, *Psammotetix sp.*, *Empoasca sp.*

Ключевые слова: симптомы фитоплазменного заболевания, Золотистое пожелтение, Почернение древесины, ПЦР, цикадки переносчики

Summary. In the last decade, phytoplasmic diseases of an epiphytotic nature such as Golden yellowing and Blackening of wood have been identified in many wine-growing countries. From 2017 to 2019 in the Republic of Moldova, surveys of production plantings of grapes were carried out in all areas of cultivation, over an area of more than 1,500 ga. Symptoms of the disease of phytoplasmic etiology were found in all European, autochthonous and new breded grapevine varieties. 270 grapevine samples were taken for PCR analysis during the visual monitoring period. As a result of the diagnosis, the causative agent of phytoplasmic disease was identified, which belongs to the stolbur subgroup – Bois noir. No quarantine disease was detected in any of the samples – Flavescence doree. Monitoring and identification of cicadas was inspected on vine plantations and adjacent territories, as a result of which were revealed *Hyalesthes obsoletus*, *Reptalus panzeri*, *Scaphoideus titanus*. *Dictyophara europaea*, *Philaenus spumarius*, *Javesella pellucida*, *Psammotetix sp.*, *Empoasca sp.*

Keywords: symptoms of phytoplasmic disease, Flavescence doree, Bois noir, PCR, leafhopper vectors

DOI: 10.32904/2412-9836-2020-12-33-40

Введение. В последние годы на плантациях винограда

лики Молдова (РМ) повсеместно встречается поражение кустов заболеванием фитоплазменной этиологии. Наиболее известными представителями этого типа заболеваний виноградной лозы являются Золотистое пожелтение (*Flavescence doree*) и Почернение древесины (*Bois noir*).

Flavescence doree (FD) и *Bois noir* (BN) представляют собой вредоносные заболевания виноградной лозы, проявляют на пораженной лозе идентичные симптомы, однако вызываются двумя генетически различимыми фитоплазмами. Заболевание FD ассоциируется с фитоплазмой типа пожелтения язв, передаваемой цикадкой (*Scaphoideus titanus*) [1, 2]. Виноградное растение для данной цикадки является растением хозяином. В то время как заболевание BN ассоциируется с фитоплазмой типа столбура, передаваемой цикадкой (*Hyalesthes obsoletus*) [3] и виноградная лоза является случайным местом кормления в жизненном цикле насекомого [4–6].

В Европейских странах установлены растения – резерваторы заболевания почернение древесины: *Convolvulus arvensis* [7] и *Urtica dioica* [8, 9]. Случаи распространения инфекции на виноградных плантациях, были зафиксированы и при произрастании других сорных растений [10, 11].

Ранее на отдельных виноградниках РМ было установлено наличие фитоплазмы (*Candidatus Phytoplasma solani*), BN, и идентифицированы потенциальные переносчики *S. titanus*, *H. obsoletus*, *Orientalus ishidaei*, *Philaenus spumarius* [12, 13]. Поэтому, для разработки мероприятий по предупреждению распространения заболеваний на виноградниках РМ, необходимо было провести визуальные обследования, определить степень распространения фитоплазменных заболеваний и идентификацию возбудителя во всех регионах возделывания винограда.

Объекты и методы исследований. Объектом исследований служили плантации винограда европейских и автохтонных сортов винограда во всех регионах возделывания винограда РМ, пораженные заболеванием фитоплазменной этиологии кусты винограда; цикадки-переносчики *S. titanus*, *H. obsoletus*, и другие потенциальные переносчики.

Мониторинг цикад-переносчиков на виноградных плантациях и прилегающих территориях проводили посредством отлова насекомых с помощью сачка и липких ловушек жёлтого цвета. Фотографирование

цикадок проводили с помощью цифровой камеры и стереомикроскопа. Фиксировали насекомых замораживанием при температуре -20°C .

Идентификацию возбудителя заболевания осуществляли в Лаборатории Вирусологии и Фитосанитарного Контроля НПИСВПТ. Для этого, во время проведения экспедиционных обследований плантаций винограда, отбирали пробы вегетативного материала со всех обследованных плантации винограда. С каждого виноградника заготовлено не менее 2-х проб. Проба для лабораторных исследований состояла из 15–20 листьев с черешками и четкими симптомами заболевания, без поражений другими патогенами, некрозов и механических повреждений. Листья пробы помещали в герметичный пластиковый пакет, подписывали и транспортировали в лабораторию в день отбора при $+4^{\circ}\text{C}$.

Выделение ДНК из тканей проводили по методике Angelini et al [14]. Молекулярный анализ проведен методом вложенной ПЦР, коммерческим набором от Qualiplant (FD / BN), для первой амплификации применены праймеры: FD9f / FD9r и STOL11f2 / STOL11r1, для второй амплификации: FD9r2 / FD9f3b и STOL11f3 / STOL11r2.

Обсуждение результатов. Наличие фитоплазменных заболеваний на плантациях винограда определяли методом экспедиционных обследований. Для этой цели в течение 2017–2019 гг. обследовано более 1500 га виноградников. Визуальный осмотр проводили в период наилучшего проявления симптомов фитоплазменного заболевания виноградной лозы. В климатических условиях Республики Молдова – это начало сентября и до конца ноября месяца. Так у белых сортов винограда (Шардоне, Рислинг, Совиньон, Алиготе и др.) в данный период времени листья приобретали золотисто-желтый цвет, становились твердыми на ощупь и скрученными краями вниз. У сильно поражаемого сорта Шардоне на листьях наблюдали некротические пятна, они скручивались до такой степени, что приобретали треугольную форму (рисунок 1).

Симптомы заболевания у сортов с красными ягодами (Каберне-Совиньон, Мерло, Пино черный, Фетяска нягрэ, Рара нягрэ, Молдова и др.) проявлялись в виде покраснения листовых пластинок.



Рисунок 1. Фитоплазменное поражение на листьях сорта Шардоне

На пораженных побегах часто обнаруживали листья, на которых покраснения занимали только один сектор, ограниченный двумя или тремя жилками, что характерно для фитоплазмоза (рисунок 2).



Рисунок 2. Фитоплазменное поражение на листьях сорта Фетяска нягрэ

Инфицированные листья выдерживали первые легкие заморозки, не теряли форму и цвет, довольно хорошо держались на лозе и были видны издалека.

Характерной особенностью данного заболевания виноградной

лозы является поражение генеративных органов. Как результат, урожай на пораженных побегах либо отсутствовал, либо был не кондиционный.

Поражённые заболеванием побеги, как правило, были зеленые, без признаков созревания и без урожая. На некоторых плантациях на пораженных заболеванием побегах наблюдали урожай, однако он был не кондиционный, сморщенный из-за частичного или полного обезвоживания, с неприятным вкусом (рисунок 3).



Рисунок 3. Проявление симптомов фитоплазменного поражения на гроздях сорта Каберне – Совиньон

Другой особенностью фитоплазменного заболевания виноградной лозы была слабая лигнификация и задержка созревания однолетнего прироста. Поражённые побеги, как правило, не вызревали от основания до верхушки и в конце вегетационного периода приобретали чёрный цвет (рисунок 4).



Рисунок 4. Проявление симптомов фитоплазменного поражения на побегах и генеративных органах

Мониторинг переносчиков. В результате отлова насекомых на виноградных плантациях и прилегающих территориях были идентифицированы общепризнанные переносчики фитоплазменных заболеваний: переносчик золотистого пожелтения винограда: *S. titanus* (рисунок 5) и переносчики почернения древесины – *H. obsoletus* (рисунок 6) и *Reptalus panzeri*, а также другие возможные переносчики: *Psammotetix sp.*, *Empoasca sp.*, *P. spumarius*, *Dictyophara europaea*, *Javesella pellucida*.



Рисунок 5. *Scaphoideus titanus*



Рисунок 6. *Nyalesthes obsoletus*

Молекулярная диагностика. В течение трёх лет было отобрано всего 270 проб листьев и лозы. Положительные результаты диагностики получены как из проб листьев с симптомами заболевания так из вызревшей лозы. На всех обследованных виноградниках установлено фитоплазменное заболевание почернение древесины. Ни одна из проб не содержала фитоплазменной инфекции золотистого пожелтения.

Выводы. Экспедиционными обследованиями плантаций винограда во всех зонах возделывания этой культуры в Республике Молдова, обнаружены кусты проявляющие симптомы заболевания фитоплазменной этиологии. Заболевание отмечено на европейских, автохтонных и новой селекции сортах винограда.

ПЦР анализ проб собранных с обследованных плантаций винограда показал наличие в тестированных пробах фитоплазмы – возбудителя заболевания почернения древесины (BN). Ни одна из проб не дала положительную реакцию на фитоплазму золотистого пожелтения винограда (FD).

Идентификация цикад отловленных на плантациях винограда и близлежащих к ним территориях показала наличие в РМ как общеизвестных *Scaphoideus titanus* и *Nyalesthes obsoletus*, так и других потенциальных переносчики: *R. panzeri*, *Psammotetix sp.*, *Empoasca sp.*, *P. sputarius*, *D. europaea*, *J. pellucida*. Роль их в распространении фитоплазменных заболеваний в Республике Молдова изучается.

Литература

1. Schwester D., Carle P., Moutous G. Nouvelles donnees sur la transmission de la flavescence doree de la vigne par *Scaphoideus littoralis* Ball // Annales de Zoologie et Ecologie Animale 1, 1969. – P. 445–465

2. Experimental transmission by *Scaphoideus titanus* ball of two molecularly distinct “flavescence doree” type phytoplasmas / N. Mori, M. Martini, A. Bressan, M. Guadagnini, V. Girolami, A. Bertaccini // *Vitis* – 2002. – 41(2). – P. 99–102.
3. Maixner M., Ahrens U., Seemuller E. Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure // *Eur J Plant Pathol* – 1995. – 101. – P. 241–250.
4. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences / I.-M. Lee, D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis & I.M. Bartoszyk // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1998. – 48. – P. 1153–1169.
5. Push and pull strategy to reduce *Hyaletthes obsoletus* population in vineyards by *Vitex agnus castus* as trap plant / T. Zahavi, S. Peles, A.R. Harari, V. Soroker, R. Sharon // *Bulletin of Insectology*. – 2007. – 60 (2). – P. 297.
6. Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyaletthesobsoletus* in Europe / J.Johannesen, B. Lux, K. Michel A. Seitz and M. Maixner // *Entomol. Exp.* – 2008. – Appl. 126. – P. 217–227.
7. The Role of *Hyaletthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the Occurrence of Bois Noir of Grapevines in France / R. Sforza, D. Clair, X. Daire, J. Larrue and E. Boudon-Padieu // *Journal of Phytopathology*. – 1998. – 146. – P. 549–556.
8. Langer M., Maixner M. Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the “stolbur”-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA // *Vitis*. – 2004. – 43. – P. 191–200.
9. Maixner M. Recent advances in “bois noir” research // *Petria*. – 2011. – 21. – P. 85–190.
10. “Bois noir” phytoplasma variability in a Mediterranean vineyard system: new plant host and putative vectors / C. Oliveri, D. Pacifico, V. D’Urso, R. La Rosa, C. Marzachi, M. Tessitori // *Australas Plant Pathol*. – 2015. – 44. – P. 235–244.
11. Molecular tracing of the transmission routes of “bois noir” in Mediterranean vineyards of Montenegro and experimental evidence for the epidemiological role of *Vitex agnus-castus* (Lamiaceae) and associated *Hyaletthes obsoletus* (Cixiidae) / A. Kosovac, S. Radonjic, S. Hrcic, O. Krstić, I. Toševski, J. Jović // *Plant Pathol*. – 2016. – 65. – P. 285–298.
12. Survey on grapevine yellows and their vectors in the Republic of Moldova / V. Bondarciuc, L. Filippin, E. Haustov, V. Forte, E. Angelini // *Proceedings of the 19th Congress of ICVG, Santiago, Chile, 2018*. – P 10. – P. 150–151.
13. Timus A.M. The invasive entomofauna of the hemimetabola group for Republic of Moldova // *Current Trends in Natural Sciences*. – 2015. – 4. – P. 32–40.
14. “Flavescence doree” in France and Italy – occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatine grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma / E. Angelini, D. Clair, M. Borgo, A. Bertaccini, E. Boudon-Padieu // *Vitis*. – 2001. – 40. – P. 79–86