

УДК 578.42:578.53:578.427

ОЗДОРОВЛЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ВИНОГРАДА С ПОМОЩЬЮ ТЕРМОТЕРАПИИ ОТ ВИРУСА GLRAV2

HEALING OF GRAPE CUTTINGS WITH THE HELP OF THERMOTHERAPY FROM THE VIRUS GLRAV2

В.К. Котляр, О.Л. Сегет

ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия, e-mail: mayuyiva@gmail.com

V.K. Kotlyar, O.L. Seget

FSBSI North Caucasian Federal Scientific Center for Horticulture, Viticulture, Wine-making”, Krasnodar, Russia, e-mail: mayuyiva@gmail.com

Аннотация. Использование здорового посадочного материала для размножения является важной мерой борьбы с вирусами винограда. В то же время, распространение по всему миру некоторых вирусных болезней плодовых культур подчеркивает необходимость проведения исследований по разработке комплекса мероприятий по освобождению посадочного материала от вирусов, позволяющих ограничить распространение вирусных заболеваний через посадочный материал. В этой статье мы предоставляем подтвержденные методом ПЦР в реальном времени результаты термотерапии, проведенной для освобождения черенков винограда от вируса скручивания листьев GLRaV2. Согласно полученным нами данным, наиболее эффективными режимами термотерапии будет сочетание высокой длительности и высокой температуры.

Ключевые слова: термотерапия, оздоровление, вирус скручивания листьев винограда, ПЦР в реальном времени, посадочный материал

Summary. The use of healthy planting material for reproduction is an important measure to combat grapevine viruses. At the same time, the worldwide spread of some viral diseases of fruit crops emphasizes the need for research and implementation of a set of measures to free planting material from viruses, as the only approaches to limiting the spread of the virus through planting material. In this article, we provide real-time PCR-confirmed results of thermotherapy performed to free grape cuttings from the leafroll virus GLRaV-2. According to our data, the most effective thermotherapy regimens will be a combination of high duration and high temperature.

Keywords: thermotherapy, healing, grapevine leafroll-associated virus, real-time PCR, planting material

DOI: 10.32904/2712-8245-2023-26-37-40

Введение. Вирус 2, ассоциированный со скручиванием листьев виноградной лозы (GLRaV 2) распространенное во всем мире вирусное заболевание виноградной лозы. Оно вызывает большие потери для всех секторов виноградарства и винодельческой промышленности [1] и считается наиболее вредоносным вирусным заболеванием винограда [2].

Смешанная вирусная инфекция на винограде представляет собой довольно частое явление на многих виноградниках в разных странах мира. Она выявляется примерно в 5–10 % случаев при тестировании на латентное поражение вирусами [3–4].

По всему миру случаи распространения вирусных болезней показывают необходимость в исследованиях и проведении комплексных мероприятий по освобождению посадочного материала от вирусов, как единственному способу ограничения проникновения вируса вегетативным способом и через посадочный материал.

Термотерапия виноградных растений, согласно многолетним исследованиям, является хорошим методом борьбы с вирусными заболеваниями для получения освобождённых от вирусов растений. Даже если вирус не уничтожен, высокая температура может замедлить его размножение и скорость заражения, что приведет к образованию новых здоровых побегов.

Термотерапия в сочетании с культурой верхушечной меристемы является основным способом получения освобождённых от вирусов растений в программах борьбы с вирусами виноградной лозы [5–7].

Объекты и методы исследования. Для идентификации РНК вирусов были отобраны молодые корни из черенков, проращённых в воде в течении трех недель и молодые листья. Всего за время проведения исследования было отобрано более 70-ти образцов из сортов селекции ФГБНУ СКФНЦСВВ: Гранатовый, Алькор, Антарис, Красностоп АЗОС, имеющих визуальные признаки поражения вирусными инфекциями. Объектом исследований являлся возбудитель болезни скручивания листьев – вирус GLRaV2.

Оздоровление растений винограда от вируса скручивания листьев проводилось согласно рекомендациям ВСТИСП [8] и было модифицировано нами: расширен диапазон температур и увеличена длительность термотерапии.

Тестирование исходных растений и растений после терапии на наличие GLRaV2 (вирус скручивания листьев) проводилось с использованием метода ПЦР в реальном времени [9]. Маркеры, использованные в исследовании, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Маркеры, использованные в исследовании

Маркер		Размер продукта (п.н.)	Источник
L2-F	ATAATTCGGCGTACATCCCCACTT	331	Bertazzon and Angelini (2004) [10]
U2-R	GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG		

Тестирование черенков проводилось в 2 этапа. Первый – во время отбора материала в летний период, когда визуальные признаки болезни наиболее явно проявляются. Отбирали кусты с четко выраженными визуальными симптомами скручивания листьев, в дальнейшем визуальные симптомы подтверждались молекулярно-генетическими методами (ПЦР в реальном времени). После наступления периода покоя и вызревания лозы в зимний период черенки отбирались и были заложены на хранение.

Второй этап тестирования проходил в весенний период проведения термотерапии для определения эффективности подобранных режимов тепловой

обработки методом ПЦР в реальном времени, теми же молекулярными маркерами, что и тестирование на этапе отбора материала.

Обсуждение результатов. Опыт по термотерапии содержал в себе 35 вариантов, каждый по 3 повторности. Предварительно заготовленные в зимний период черенки винограда достали из камеры хранения, где они провели не менее двух месяцев при +4°C и невысокой влажности, далее каждый черенок был разрезан на три равные части и отправлен на термотерапию. Дабы предотвратить излишнюю потерю влаги и гибель черенка, все они перед термотерапией были замочены в чистой воде на 3 часа.

Прошедшие термотерапию черенки были поставлены на проращивание, после чего мы отобрали молодые листья для выделения из них РНК патогена для последующего проведения анализа ПЦР в реальном времени.

В таблице 2 отражены результаты проведенной нами серии опытов по термотерапии для освобождения черенков винограда от вируса скручивания листьев (GLRaV2). Знаком (+) отмечены те варианты, в которых вирус был обнаружен как до, так и после термотерапии, а знаком (–) помечены те варианты, в которых после проведения термотерапии нами не было обнаружено вирулентной РНК, иными словами это оздоровленные черенки для последующего производства свободного от вируса скручивания листьев посадочного материала, которые могут использоваться как для прививки, так и для высадки в грунт в качестве корнесобственного саженца.

Таблица 2. Результаты термотерапии

Градусы (°C)	GLRaV2														
	Время (мин)														
	10			20			30			40			50		
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
35	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Самую высокую эффективность оздоровления от вируса скручивания листьев 2 показали следующие режимы: 50 минут при температуре в диапазоне 40–60 °C, 40 минут при температуре 35, 40, 50, 60 °C и 30 минут при максимальной температуре 60 °C, что говорит о том, что данный тип вируса более термолабилен, чем вирус скручивания листьев -1 и менее подвержен разрушению при данном диапазоне температур, что было подтверждено нами в других работах.

Элиминация вируса наблюдалась при температурных режимах 30–35 °С и продолжительности 50 минут, что может говорить о низкой концентрации вируса в данных образцах и подтверждать нашу теорию о том, что длительность для оздоровления черенков винограда имеет большее значение, чем диапазон температур. Для уточнения полученных данных о снижении концентрации вируса в будущем будет использована количественная ПЦР в реальном времени.

По итогам исследований оказалось, что только 37 % черенков, прошедших термотерапию, оказались оздоровлёнными, в дальнейшем они могут использоваться для создания свободного от вируса скручивания листьев посадочного материала.

Выводы. Предварительно можно сделать выводы о наиболее оптимальных параметрах оздоровления черенков винограда от вируса GLRaV2 методом термотерапии – тепловая обработка черенков в течение 40-50 минут при температуре 40-60 °С. В дальнейшем предполагается провести изучение влияния термотерапии на рост и развитие оздоровлённого растения.

Литература

1. Ecology and management of grapevine leafroll disease / R. Almeida, K. Daane, V. Bell, G.K. Blaisdell, M. Cooper, E. Herrbach, G. Pietersen // *Front. Microbiol.* 2013. № 4. С. 94.
2. Chronological Study on Grapevine Leafroll-Associated Virus 2 in Australia / N. Habili, Q. Wu, A. Rinaldo, F.A. Constable // *Viruses.* 2023. №15(5). С. 1105.
3. Лосева Д.Ю., Мулюкина Н.А. Комплексная вирусная инфекция при поражении скручиванием листьев винограда // *Виноградарство и виноделие.* 2011. Т. 41. №. 1. С. 36–37.
4. Saritas K., Topkaya S. Genetic variability of Grapevine Leafroll-Associated Virus-1, 2, 3, 4 Infecting Vineyards in Tokat Province of Turkey // *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi.* 2021. Т. 7. №. 3. С. 438–446.
5. Panattoni A., Triolo E. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB // *Scientia Horticulturae.* 2010. Т. 125. №. 1. С. 63–67.
6. Milkus B.N., Avery Jr J.D., Goodman R.N. Detection of viruses in grapevines imported in Missouri from Eastern European countries // *Detection of Viruses in Grapevines Imported in Missouri from Eastern European Countries.* 2000. С. 1000–1003.
7. Developing virus-free grapevine explants by using silver-nanoparticles and its comparison with chemo and thermotherapy-based approaches / K. Dolatabadi, G. Davarynejad, M. Safarnejad, Z. Ghayoor // *Journal of Crop Protection.* 2023. Т. 12. №. 1. С. 15–27.
8. Производство и сертификация посадочного материала ягодных культур и винограда в России. Контроль качества. Ягодные культуры (метод. указания). М.: ВСТИСП, 2009. Ч. 1. 164 с.
9. Real-time RT-PCR (TaqMan) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1–5 and 9 / F. Osman, C. Leutenegger, D. Golino, A. Rowhani // *Journal of virological methods.* 2007. № 141 (1). С. 22–29.
10. Bertazzon N., Angelini E. Advances in the detection of Grapevine leafroll-associated virus 2 variants // *Journal of Plant Pathology.* 2004. С. 283–290.