

ФИТОСАНИТАРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ АВТОХТОННЫХ СОРТОВ ВИНОГРАДА

Бондарчук В.В., Султанова О.Д., Хаустов Е.И.

*Научно-практический институт садоводства, виноградарства и пищевых технологий.
г.Кишинэу, Республика Молдова.*

Abstract

The results of the selection of healthy clones of autochthonous varieties of grapes on the basis of data on the phytosanitary condition of the grape plantations in the Republic of Moldova, the modern methods of diagnostics, thermotherapy vine and micro propagation culture «in vitro». The practical uses of the research yielded a collection of phytosanitary clones of autochthonous grape varieties are free from virus, phytoplasma and bacterial infection.

Key words: grapes, methods of diagnostics, thermotherapy, micro propagation, virus, phytoplasma, bacterial infection.

Введение

Существующие плантации автохтонных сортов винограда в основном очень старые с высокой изреженностью и большинстве своем в очень плохом фитосанитарном состоянии в отношении вирусных заболеваний и бактериального рака.

Заболевания винограда вирусной и бактериальной этиологии в силу их хронического характера являются причиной постоянного снижения количества и качества урожая, вырождения кустов и ранней изреженности виноградников.

В настоящее время в практике защиты растений отсутствуют препараты для прямого воздействия на возбудителей данного рода заболеваний. Основным методом в борьбе с вирусными болезнями и бактериальным раком является получение и размножение свободных от этих заболеваний клонов винограда. Безвирусные и свободные от бактериального рака клоны, изученные в генетическом плане, отличаются повышенными показателями урожая, как в качественном, так и в количественном отношении. Существует несколько методов получения исходных здоровых клонов винограда:

1. Импорт исходных здоровых клонов из-за рубежа. Данный способ наиболее быстрый. Однако он пригоден только для европейских сортов винограда. Кроме этого существует опасность ввоза в страну вредителей и болезней, которые в новых условиях развития могут быть очень вредоносными.

2. Фитосанитарный отбор здоровых клонов на существующих насаждениях винограда. Данный метод является первостепенным при получении безвирусных и свободных от бактериального рака как автохтонных, так и новых сортов винограда.

3. Лечение зараженных клонов методами термо или химиотерапией с последующим тестированием и ускоренным размножением здоровых растений.

Получение исходных здоровых клонов винограда методом фитосанитарного отбора представляет собой процесс, включающий ряд взаимосвязанных этапов работ, проводимых в следующей последовательности: визуальный отбор бессимптомных кустов, тепличный провокационный тест на прижилковую мозаику, индексация на индикаторных сортах винограда, серодиагностика [1]. Однако в процессе совершенствования методов диагностики и увеличения списка заболеваний, данный порядок тестирования претерпел ряд изменений. Первостепенным в данном вопросе является получение свободных от хронических заболеваний клонов винограда.

Материалы и методы

Материалом исследований служили насаждения автохтонных сортов винограда произрастающих на плантациях республики селекционных участках НПИСВиПТ.

Диагностика вирусной инфекции в виноградной лозе проводилась методом ELISA-test[4]., который позволяет быстро и надежно диагностировать вирусы комплекса

короткоузлия (GFLV), серотипов скручивания листьев (GLRaV1 и GLRaV3), мраморности (GFlek) и борозчатости древесины (GVA).

Тестирование на латентную форму бактериального рака проводилась микробиологическим методом, включающим в себя посев образцов на селективную среду Roy, Sasser[7] с последующей идентификацией возбудителя.

Пробы для тестирования готовили методом экстрагирования из опилок, полученных из тестируемой виноградной лозы. Для диагностики вирусных заболеваний в экстрактивном буфере, а для бактериального рака в стерильной водопроводной воде.

Результаты и обсуждения

Визуальный отбор кустов винограда без симптомов вирусных, фитоплазменных и бактериальных заболеваний. На виноградниках Молдовы идентифицированы 11 вирусов и вирусных заболеваний винограда. Изучением динамики проявления симптомов вирусных заболеваний в течение вегетации установлены сроки наилучшего их проявления на различных органах инфицированных кустов. Так, мозаичные симптомы заболеваний вирусной этиологии такие, как прижилковая мозаика, короткоузлие, инфекционный хлороз, очень четко проявляются в период цветения винограда, конец мая - начало июня. Во время созревания винограда, конец августа – сентябрь, хорошо различимы симптомы поражения вирусной инфекцией в виде нарушения окраски листьев, деформации листьев и побегов. В это же время можно наблюдать кусты винограда, пораженные золотистым пожелтением. У инфицированных, данным заболеванием, кустов листья приобретают золотисто-желтую с металлическим блеском окраску у белых сортов и красную у красных, становятся твердыми на ощупь и скручиваются краями вниз. При визуальном осмотре плантаций, как в первом, так и во втором периоде, выбраковываются кусты с симптомами: прижилковой мозаики, короткоузлия, инфекционного хлороза, окаймления жилок, скручивания листьев и золотистого пожелтения. Осенью, при заготовке лозы, отмеченные внешне здоровые кусты, проверяются на наличие или отсутствие симптомов борозчатости древесины, короткоузлия на лозе и бактериального рака [рис.1].

Фитосанитарный отбор бессимптомных кустов проводился совместно с селекционерами. В работу включали только кусты с характерными для сорта ампелографическими данными, отличающиеся повышенной урожайностью и качеством гроздей.

В результате визуальных обследований в 2009 - 2010г было отобрано 45 внешне здоровых, высокоурожайных с хорошим качеством ягод кустов винограда следующих сортов: Rara neagră, Fetească neagră, Fetească albă, Fetească regală, Codrinschii.

Провокационный тест на прижилковую мозаику.

Тепличный, провокационный тест на прижилковую мозаику основан на свойстве данного заболевания проявлять четкие симптомы весной в условиях теплицы. В настоящее время этот тест проводится нами при выгонке вегетативной массы клонов для введения их в культуру «in vitro». Лоза, заготовленная от внешне здоровых кустов, делится на две части. Одна часть нарезается на двухглазковые черенки и высаживается в горшки с почвенной смесью в условиях теплицы [рис.2]. Симптомы заболевания проявляются на первых двух – трех листьях побегов. Кусты, проявившие симптомы прижилковой мозаики, исключаются из дальнейшей работы. Другая часть заготовленной лозы используется для диагностики латентной инфекции вирусных заболеваний и бактериального рака.

Тесты на латентную инфекцию вирусных заболеваний и бактериального рака винограда. В результате тестирования установлено, что из 45 кустов, отобранных для дальнейшего тестирования на наличие вирусов и бактериальный рак, 23 куста (51,12%) оказались инфицированными и только 22 были свободными от этих заболеваний. Кусты, давшие положительную реакцию в процессе тестирования хотя бы на одно из заболеваний, исключались из дальнейшей работы.

Кусты, показавшие отрицательные результаты на всех этапах тестирования, считались свободными от вирусной и бактериальной инфекции. Размножение исходных фитосанитарных клонов проводили методом культуры «in vitro».

Микроклональное размножение

Исходным материалом для введения клонов в культуру *in vitro* служили зеленые побеги отобранных безвирусных и свободных от бактериального рака кустов винограда, культивируемых в условиях теплицы.

Высадку первичных инициальных эксплантатов размером 0,8-1,0 см проводили на агаровую питательную среду. Укорененные инициальные растения черенковали, и дальнейшее микроклональное размножение осуществляли на ионитном субстрате БИОНА-312 [рис.2]. После проведения периода адаптации, растения высаживали в горшки с почвенной смесью в условиях теплицы.

Коллекция фитосанитарных клонов винограда.

Коллекция фитосанитарных клонов винограда (*nuclearstock*) [5] выращивается в условиях теплицы. Для предупреждения вторичного заражения, растения содержатся в горшках с почвенной смесью, свободной от нематод-переносчиков [рис.2]. Ежегодно проводятся обработки против грибных болезней, вредителей и насекомых – переносчиков. Каждый клон представлен в количестве 5 растений. В случае необходимости более быстрого размножения определенного клона он выращивается в количестве 10-и и более растений. Ежегодно коллекция клонов проходит ретестирование на латентную инфекцию вирусных заболеваний и бактериального рака. Лоза из коллекции клонов используется для создания маточника исходных клонов винограда.

Маточник исходных клонов винограда.

Под маточник исходных клонов отведен участок земли, где виноград не выращивался последние 15 лет. Почва на участке проверена на отсутствие нематод-переносчиков вирусов. Участок закладывается привитой культурой. Для этого используется метод зеленых прививок на сеянцы, полученные из семян подвоя БхР Кобер 5ББ биологической категории «Базисный». В качестве привоя используется лоза фитосанитарных клонов из коллекции, растущей в теплице [рис.2].

Выводы

Полученные результаты по отбору здоровых клонов автохтонных сортов винограда свидетельствуют о том, что заражение вирусными заболеваниями и бактериальным раком автохтонных сортов винограда составляет 51,12%. Современные методы диагностики позволяют надежно и в кратчайшие сроки диагностировать основную массу вирусов и бактериального рака в лабораторных условиях. Таким образом, тестированием большого количества кустов, можно отобрать безвирусные и свободные от бактериального рака клоны. В настоящее время на плантациях винограда Республики Молдова все большее распространение получает опасное заболевание фитоплазменной этиологии золотистое пожелтение (*Flavescensedoree*) [3]. Мерой борьбы с данным заболеванием на виноградниках являются химические обработки против цикады переносчика, а обеззараживание лозы и саженцев проводится методом горячей водной терапии [3,5]. Горячая водная обработка вызревшей лозы и саженцев при температуре $50^{\circ}\text{C}\pm 1$ в течение 30 мин дает хорошие результаты и в борьбе с возбудителем бактериального рака винограда *Agrobacterium vitis* [2]. Исходя из выше изложенного, отбор фитосанитарных клонов винограда, рекомендуется проводить в следующей последовательности:

1. Визуальный отбор кустов без симптомов вирусных, фитоплазменных заболеваний и бактериального рака;
2. Горячая водная терапия виноградной лозы;
3. Тесты на наличие вирусной и бактериальной инфекции;
4. Тепличный провокационный тест на прижилковую мозаику;
5. Микроклональное размножение в культуре *in vitro*;



Рис.1. Симптомы вирусных заболеваний и бактериального рака винограда:
1.1. Прижилковая мозаика Veinmosaic, 1.2. Короткоузлие GFLV, 1.3. Желтая мозаика GJMV,
1.4 Бактериальный рак винограда Agrobacterium vitis, 1.5. Скручивание листьев GLRV, 1.6.
Золотистое пожелтение (Flavescence dorée).



Рис.2. Ускоренное размножение здоровых клонов винограда:

2.1. Тепличный провокационный тест на прижилковую мозаику (выгонка лозы для введения в культуру „in vitro») 2.2. Микрклональное черенкование; 2.3. Коллекция фитосанитарных клонов; 2.4. Закладка маточника исходных клонов винограда методом зеленых прививок.

6. Закладка коллекции фитосанитарных клонов винограда в условиях теплицы.

Практическое использование данной системы фитосанитарного отбора позволило получить коллекцию фитосанитарных клонов автохтонных сортов винограда свободных от вирусной, фитоплазменной и бактериальной инфекции включающую сорта Rara neagră -1 клон, Fetească neagră-4 клон, Fetească albă-7 клонов, Fetească regală-8 клонов, Codrinschii – 2 клон.

Библиография

1. Получение безвирусных клонов винограда путем отбора / В.В Бондарчук. В.Г. Маринеску в кн: Вирусные, микоплазменные и бактериальные болезни плодовых культур и винограда в Молдавии. Кишинев. 1980.- С. 78-93.
2. Бондарчук В.В. Султанова О.Д., Исак А. С. Горячая водная терапия виноградной лозы в борьбе с *Agrobacterium vitis* // Realizări inovative in domeniul vitivinicol.-Chişinău. 2008.- С.82-84.
3. Бондарчук В.В. Султанова О.Д. Константинова И.С. Исак А.С. Золотистое пожелтение *Flavescensedoree* винограда в Молдове //Виноградарство и виноделие в Молдове.- 2010.- №3 (27).-С. 23-25.
4. Clarc M., Adams A., Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immuno sorbent assay for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol.-1983.-vol.34. P. 475-483.

5. Codvell A, Larrue J, Valat C., Grenan S. Les transmites a l'eauchnde des bois de vigneatteints de la Flavescensedoree // P.A.V.. 1990.- 107, № 126P. 281 -286.
6. Martelli G.P. and Walter B. Virus Certification of Grapevines. Plant Virus Disease Control, Ghapter 20 P. 261-276, editedby A. Hadidi, R.K. Khtarpaland H. Koganezawa. APS PRES-SS. 1998.
7. Roy M. and Sasser M. Medium selective A. tumefaciens biotipe 3 // Phytopatology. 1983.- vol.73.- P. 810.