

УДК: 634.8: 632.953

ГОРЯЧАЯ ВОДНАЯ ТЕРАПИЯ В ФИТОСАНИТАРНОЙ СЕЛЕКЦИИ ВИНОГРАДА

HOT WATER THERAPY IN PHYTOSANITARY SELECTION OF GRAPEVINE

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

M.V. Dubchak, E.I. Haustov
O.D. Sultanova, V.V. Bondarchuk

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

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

Аннотация. Испытана возможность проведения горячей водной терапии (ГВТ) в процесс получения исходных здоровых клонов винограда методом фитосанитарного отбора. Задача ГВТ - максимальное удаление инфекционных начал фитоплазменных, бактериальных и грибных заболеваний при сохранении жизнеспособности виноградной лозы. В результате исследований было установлено, что применение ГВТ при температуре 51°C не повлияло на развитие виноградных черенков и на жизнеспособность глазков. Процент проросших черенков составил 76–92%. ГВТ привойных и подвойных лоз для производства саженцев винограда, не оказала отрицательного влияния и на каллусообразование и приживаемость компонентов прививки. Выход стандартных саженцев составил 92,5–97,2 % в зависимости от сорта. Включение ГВТ в процесс фитосанитарной селекции, а также при выращивании саженцев для маточных насаждений винограда, позволит значительно повысить гарантию закладки промышленных насаждений посадочным материалом свободном от фитоплазменной, бактериальной и грибной инфекции.

Ключевые слова: горячая водная терапия, фитосанитарная селекция, клоны, латентная инфекция, диагностика, заболевания винограда.

Summary. The possibility of incorporating hot water therapy (HWT) into the process of obtaining the initial healthy grapevine clones by phytosanitary selection was tested. The task of HWT is the maximum removal of infectious principles of phytoplasmic, bacterial and fungal diseases while maintaining the viability of the vine. As a result of the studies, it was found that processing grapevine cuttings at a temperature of 51°C for 45 minutes does not affect the viability of the vine: the percentage of sprouting of the eyes and rooting of the cuttings was 76–92%. The HWT of the graft and rootstock vines during the cultivation of grafted grape seedlings did not adversely affect the callus formation and survival rate of the grafting components. The percentage of receiving standard seedlings depended on the variety and conformed from 92,5 to 97,2 %. The inclusion of HWT in the process of phytosanitary selection and growing seedlings for uterine plantings of grapes will significantly increase the guarantee of planting industrial vineyards with biological material that will be free from phytoplasm, bacterial and fungal infections.

Keywords: hot water therapy, phytosanitary selection, clones, latent infection, diagnosis, grape diseases

DOI: 10.32904/2412-9836-2020-13-16-24

Введение. Заболевания винограда вирусной и бактериальной этиологии в силу их хронического характера являются причиной постоянного снижения количества и качества урожая, вырождения кус-

тов и ранней изреженности виноградников.

Фитовирусы, фитоплазмы равно как и фитобактерии поражают виноградное растение системно. Это значит, что заражённые растения остаются больными в течение всей своей жизни. Системный характер заражения способствует широкому распространению путём вегетативного размножения заражённых кустов, что приводит к производству больного посадочного материала.

В практике защиты растений отсутствуют препараты для прямого воздействия на возбудителей данного рода заболеваний. Единственным, эффективным, способом борьбы с вирусными заболеваниями в настоящее время признана система санитарной селекции, основанная на получении здорового посадочного материала и закладки им новых насаждений в условиях, исключающих вторичное заражение.

Получение исходных здоровых клонов винограда методом фитосанитарной селекции представляет собой процесс, включающий ряд взаимосвязанных работ, проводимых в следующей последовательности: визуальный отбор бессимптомных кустов, тестирование на латентную инфекцию вирусных, бактериальных и фитоплазменных заболеваний, ускоренное размножение и закладка маточника предварительного размножения. Визуальный отбор бессимптомных кустов проводится, как правило, на старых плантациях винограда, отличающихся крайней неоднородностью кустов. При обследовании таких плантаций встречаются хорошо развитые, высокопродуктивные с хорошим качеством урожая кусты, соседствующие с кустами, поражёнными бактериальным раком, вирусными и фитоплазменными заболеваниями, а также заболеваниями многолетней древесины. Постоянно меняющееся фитосанитарное состояние плантаций винограда вследствие прогрессирующего развития ряда особо вредоносных заболеваний [1–4], обуславливает необходимость постоянного совершенствования системы фитосанитарной селекции, главной задачей которой является гарантированное получение максимально здоровых в фитосанитарном отношении исходных клонов винограда.

Объекты и методы исследований. Материалом для исследований служили автохтонные и новой селекции сорта винограда произрастающие на плантациях Республики Молдова и селекционных участках НПИСВиПТ.

Черенки виноградной лозы, заготовленные для диагностики на латентную инфекцию вирусных заболеваний и бактериального рака, а также черенки подвойных и привойных лоз, заготовленные с маточника биологической категории «ПРЕДБАЗИСНЫЙ» для производства привитых саженцев.

Диагностика вирусной инфекции в виноградной лозе проводилась методом ELISA-test по Clarc and Adams [5], который позволяет быстро и надёжно диагностировать вирусы комплекса короткоузлия (GFLV), серотипов скручивания листьев (GLRaV1 и GLRaV3), мраморности (GFkV) и бороздчатости древесины (GVA).

Диагностику фитоплазменной инфекции проводили молекулярным методом. Для извлечения ДНК из тканей проб виноградной лозы применяли метод Angelini et al. [6]. Молекулярный анализ проведён методом Вложенной ПЦР, коммерческим набором от Qualiplant (Flavescence dorée / Bois noir), для первой амплификации применены праймеры: FD9f / FD9r и STOL11f2 / STOL11r1, для второй амплификации: FD9r2 / FD9f3b и STOL11f3 / STOL11r2. Визуализация результатов ПЦР проведена при электрофоретическом разделении молекул ДНК по размеру, в 1% агарозном геле, с добавлением флуоресцирующего красителя.

Тестирование на латентную форму бактериального рака проводили 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 накопительной среде.

Горячая водная терапия черенков протоклонов проводилась в лабораторном термостате ЛП-516, тип 1387, при температуре 51°C в течение 45 минут. Обработку привойной и подвойной лозы для выращивания привитых саженцев осуществляли в установке собственной конструкции при температуре 50°C ±0,5 в течение 45 минут. В обоих случаях температуру воды контролировали ртутным термометром.

Обсуждение результатов. Первым этапом в получении исходных здоровых клонов винограда является отбор визуально бессимптомных кустов-протоклонов, которые проводили методом визуальных обследований в течение вегетационного периода. Первое визуальное обследование проводили в период цветения винограда. При этом обследовании исключали кусты проявляющие мозаичные симптомы вируса короткоузлия (*GFLV*) и его штаммы (окаймление жилок *GVBV* и жёлтой мозаики *GYMV*), прижилковой мозаики (*GVMV*).

В период второго обследования (созревания винограда) исключали кусты с симптомами короткоузлия на лозе, вируса скручивания листьев, жёлтой мозаики, фитоплазменных заболеваний (*FD*, *BN*) и бактериального рака (*Agrobacterium vitis*).

Таким образом, в течение вегетационного периода отбирали кусты без симптомов вирусных, фитоплазменных и бактериальных заболеваний, отличающихся продуктивностью и качеством урожая, а также и другими хозяйственно-ценными признаками и соответствующие ампелографическому описанию.

Осенью во время заготовки лозы с отобранных кустов, обращали внимание на наличие симптомов короткоузлия на лозе, бактериального рака и бороздчатости древесины на штамбе и рукавах. Лозу с каждого куста собирали отдельно и отмечали этикеткой с указанием сорта, площади, квартала, ряда, пролёта и номера куста. Хранили лозу при температуре +5°C в условиях исключаяющих подсыхание.

На втором этапе фитосанитарной селекции проводили тестирование латентной инфекции вирусных, фитоплазменных заболеваний и бактериального рака винограда. Тестированием виноградной лозы, в рамках фитосанитарной селекции за период 2016–2019 установлено, что 42,5 % биотипов были инфицированы заболеваниями вирусной этиологии, а 28% бактериальным раком винограда *Agrobacterium vitis*. Из вирусных заболеваний наибольший процент поражения (17,1 %), составляет вирус скручивания листьев третьего серотипа GLRaV-3 и в меньшей степени (7,1 %) вирус скручивания листьев первого серотипа GLRaV-1. Вирус мраморности листьев винограда GFkV тестирован у 15,42 % биотипов, а вирусом бороздчатости древесины GVA поражены 4,17 %. Следует отметить, что биотипы могли быть инфицированы одним или несколькими вирусами, а так же бактериальным раком. Так, например, биотип сорта Молдова 8-1-1 инфицирован вирусом мраморности листьев GFkV, биотип Молдова 7-2-1 вирусом мраморности листьев GFkV и вирусом скручивания листьев первый серотип GLR-1, а биотип Молдова 8-1-2 инфицирован вирусом мраморности листьев GFkV, скручиванием листьев серотип три GLR-3 и бактериальным раком *Agrobacterium vitis*.

При визуальном обследовании плантаций с целью отбора здоровых протоклонов, кусты с симптомами хронических заболеваний отмечали и исключали уже на первом этапе фитосанитарной селекции. В процессе получения здоровых клонов может попасть лоза в начальной стадии инфицирования, которая визуально не отличается от здоровой. Ввиду незначительного содержания инфекционного начала, такая лоза может показать отрицательный результат даже при тестировании высокочувствительными методами. Данный вариант развития представляет серьёзную опасность для виноградарства, что особенно важно при закладке маточных насаждений винограда. Во избежание включения в селекционный процесс лоз, содержащих возбуди-

телей заболеваний на стадии инкубации, применяли метод горячей водной терапии. С этой целью лозу каждого биотипа нарезали на 2-х глазковые черенки и вымачивали в течение суток при комнатной температуре. Горячую водную терапию (ГВТ) проводили в лабораторном термостате при температуре 51° С в течение 45 минут. Результаты обработки представлены в таблице 1.

Таблица 1. Горячая водная терапия черенков виноградной лозы 20.01.2020

№ п/п	Сорт	Кол-во черенков обработанных ГВТ, шт.	из них прижившихся	
			шт.	%
1	Оницканский белый	26	24	92,31
2	Луминица	17	15	88,2
3	Бусуек де Молдова	30	24	80,00
4	Бусуек де Бохотин	21	16	76,19
5	Фетяска регалэ	33	30	90,91

После обработки черенки выдерживали при комнатной температуре для медленного остывания, после чего высаживали в кассеты с торфяным субстратом. Через 7 дней после посадки в кассеты наблюдали заметное набухание глазков, а на 14-й день было отмечено прорастание почек (рисунок 1). Спустя 1,5 месяца был проведён первый срез верхушек для введения сортов в культуру *in vitro*.

Как видно из таблицы 1, процент проросших и укоренившихся черенков после ГВТ варьирует от 76 до 92 %. Такого количества растений вполне достаточно для выгонки вегетативной массы необходимой для введения в культуру *in vitro* и ускоренного размножения методом микроклонального черенкования.

Наблюдениями за ростом и развитием обработанных черенков установлено, что горячая водная терапия при температуре 51°С в течение 45 минут не оказывает губительного действия на виноградную лозу и жизнеспособность глазков, поэтому с успехом может использоваться в работе по фитосанитарной селекции.



Рисунок 1. Проросшие черенки винограда на 14-й день после термообработки

Согласно принятой в Республике Молдова системе сертифика-

ции посадочного материала винограда, производственные плантации необходимо закладывать саженцами биологической категории «СЕРТИФИЦИРОВАННЫЙ». Подвойная и привойная лоза для производства таких саженцев выращивается в маточных насаждениях биологической категории «БАЗИСНЫЙ». Получение исходных клонов, ускоренное размножение, закладка маточных насаждений «ПРЕДБАЗИСНЫЙ и «БАЗИСНЫЙ» проводится в НПИСВиПТ. В маточник биологической категории «ПРЕДБАЗИСНЫЙ» высаживаются корнесобственные саженцы клонов винограда, размноженных методом микроклонального черенкования *in vitro*. В настоящее время на данной плантации выращиваются клоны 32 привойных и 3 подвойных сорта винограда. Сортимент маточника ежегодно пополняется. Назначение маточника «ПРЕДБАЗИСНЫЙ» – выращивание привойной и подвойной лозы для производства привитых саженцев с целью закладки маточных насаждений биологической категории «БАЗИСНЫЙ». Назначение маточных насаждений категории «БАЗИСНЫЙ» – выращивание привойной и подвойной лозы для производства привитых саженцев винограда биологической категории «СЕРТИФИЦИРОВАННЫЙ» и закладки ими промышленных виноградников. Поскольку маточники этой категории предназначены для массового производства посадочного материала, важно закладывать их максимально здоровыми в фитосанитарном отношении саженцами.

В НПИСВиПТ это достигается следующим образом:

1. Фитосанитарное состояние маточника «ПРЕДБАЗИСНЫЙ» контролируется путем визуальных обследований и ежегодных ретестирований на вирусные, фитоплазменные и бактериальные заболевания винограда;
2. Плантация содержится на высоком агротехническом уровне: проводятся регулярные обработки почвы против сорняков, химические – против вредителей, болезней, а также насекомых-переносчиков фитоплазменных заболеваний винограда;
3. Черенки привойной и подвойной лоз, используемые для выращивания саженцев для посадки маточника биологической категории «БАЗИСНЫЙ», проходят обработку горячей водной терапией.
4. В целях предупреждения инфицирования посадочного материала в школке, саженцы для маточника выращиваются в контролируемых условиях теплицы в кассетах с торфяным субстратом (рисунки 2).

Посадка плантации биологической категории «БАЗИСНЫЙ» в НПИСВиПТ начата в 2019 году саженцами столовых сортов винограда Осенний чёрный, Сурученский белый, Кодрянка, Гузун, Яловенский

устойчивый и технического назначения Виорика и Ритон.



Рисунок 2. Привитые саженцы винограда, полученные из привойной и подвойной лозы прошедших ГВТ

В 2020 году посадки в «БАЗИСНЫЙ» маточник будут продолжены. Заготовленную лозу для выращивания привитых саженцев хранили в помещении при температуре 5°C с высокой влажностью. Непосредственно перед прививкой черенки привойных и подвойных лоз были подвергнуты горячей водной терапией при температуре 50 °C в течение 45 минут. Анализ состояния прививок после стратификации показал, что все прививки образовали хорошо развитый круговой каллус. У большинства прививок были проросшие глазки привоя. После переборки и сортировки прививки повторно парафинировали и сажали в кассеты с торфяным субстратом в теплице. Спустя 1,5 месяца, перед высадкой в маточник, сделаны учёты по выходу стандартных вегетирующих саженцев. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние горячей водной терапии на выход привитых саженцев винограда

№ п/п	Сорт	Количество привойных и подвойных черенков		
		обработанных ГВТ		из них получено саженцев
		шт.	шт.	%
1	Виорика / Б × Р SO4	3500	3402	97,20
2	Ритон / Б × Р SO4	2000	1926	96,30
3	Фетяска нягрэ / Б × Р SO4	800	763	95,34
4	Молдова / Б × Р SO4	800	755	94,38
5	Флоричика / Б × Р SO4	800	750	93,75
6	Легенда / Б × Р SO4	400	370	92,50

Как видно из таблицы 2 обработка горячей водой черенков привойных и подвойных лоз не оказывает отрицательного действия на лозу, почки, каллусообразование и приживаемость компонентов прививки. Выход стандартных саженцев составил 92,5–97,20 %.

К моменту посадки в маточник саженцы имели прирост 21–27 см, 6–8 листьев и развитую корневую систему.

Об эффективности применения горячей водной терапии для по-

давления различных инфекций в посадочном материале винограда, не влияя на вегетативное развитие виноградной лозы сообщают многие исследователи. Так, Манини с сотрудниками показали, что обработки горячей водой при температуре 50°C в течение 45 минут подавляют фитоплазменную инфекцию в посадочном материале винограда, сохраняя при этом его высокую жизнеспособность [8]. Горячая водная терапия также эффективна в подавлении заболеваний бактериальной этиологии: бактериального рака (*Agrobacterium vitis*, *Agrobacterium tumefaciens*), бактериального некроза, бактериального увядания (*Xylophilus ampelinus*), болезни Пирса (*Xylella fastidiosa*) [9–11].

Обработка горячей водой привитого посадочного материала инактивирует также возбудителей заболеваний многолетней древесины виноградного куста грибной этиологии (эска, черная пятнистость, эутипоз и др.), таких как *Phaeomoniella chlamydospora* (Pch), *Diplodia seriata* (Ds), *Neofusicoccum parvum* (Np) и *Botryosphaeriaceae sp.* [1, 2].

Выводы. Исходя из вышеизложенного, горячая водная терапия является необходимым и важным этапом в фитосанитарной селекции, способствующим получению здоровых клонов винограда.

Включение горячей водной терапии в процесс фитосанитарной селекции, а также при выращивании саженцев для маточных насаждений винограда позволит, значительно повысить гарантию закладки промышленных насаждений винограда посадочным материалом свободным от фитоплазменной, бактериальной и грибной инфекций.

Литература

1. Esca et Black Dead Arm: deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne / P. Larignon, F. Fontaine, S. Farine, C. Clément // C. R. Biologies, 332, – 2009. – P.765–783.
2. Viability of brotyosphaeriacea species pathogenic to grapevine after hot water treatment. Phytopathologia / G. Elena, V. Di Bella, J. Armengol, J. Luque // Mediterranea. – 2015. – Т.54 (2). – P. 325–334.
3. Waite H., Morton L. Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material // Phytopathologia Mediterranea. – 46. – 2007. – P. 5.
4. Piano S., Costa C. La termoterapia in acquacalda come Sistema di lotta al fitoplasmidellavite // Manuale per la lotta a fitoplasmidellavite. – edito da Provincia di Asti, 2017.
5. Clarc M., Adams A. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // J. Gen. Virol. – vol.34. – 1983. – P. 475–483.
6. Angelini E., Clair D., Borgo M. et al 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 // Vitis. – 2001. – 40. – P. 79–86.
7. Roy M., Sasser M. Medium selective *A. tumefaciens* biotip 3 // Phytopathology. – V. 73. – 1983. – P. 810.
8. Phytoplasma diffusion through grapevine propagation material and hot water treatment / F. Mannini, N. Argamante, G. Gambino, A. Mollo // Progrès agricole et viticole, Hors série – Extended abstracts 16th meeting of ICGV, Dijon. – France, 2009. – P. 182–183.

9. Бондарчук В., Султанова О., Константинова И. Влияние горячей водной обработки на системную инфекцию бактериального рака и на качество виноградных саженцев // Международный научно-тематический сборник Виноградарство и виноделие НИВиВ им. Таирова. Одесса, 2008. – С. 57–61.

10. Оздоровление виноградной лозы от *Agrobacterium vitis* (var *tumefaciens*) методом термотерапии / В. Бондарчук, О. Султанова, Е. Хаустов, Д. Даду // *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*. – №.6, (54). – 2014. – С. 25–27.

11. Hot-water treatment of dormant grape cuttings: its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine / C. Bazzi, E. Stefani, R. Gozzi, T.J. Burr, C.L. Moore, F. Anaclerio // *Vitis*. – 1991. –30. P. 177–187.