

## **Биотехнология получения здоровых клонов винограда.**

**Хаустов Е.И., Проданюк Е.Р., Султанова О.Д., Бондарчук В.В.**

Научно-практический Институт Садоводства, Виноградарства и Пищевых Технологий  
г. Кишинэу, Республика Молдова

### **АННОТАЦИЯ**

Предложена технология получения здоровых клонов винограда, основанная на применении современных методов диагностики вирусных заболеваний и бактериального рака, клонального микроразмножения в культуре «in vitro». Практическое применение данной системы позволило получить коллекцию фитосанитарных клонов винограда, свободных от вирусной и бактериальной инфекции.

**Ключевые слова:** латентная инфекция вирусных болезней и бактериального рака; фитосанитарные клоны; микрклональное размножение; штаммы-антагонисты.

### **ВВЕДЕНИЕ**

Характерной особенностью поражения виноградной лозы, как вирусными заболеваниями, так и бактериальным раком является то, что оно системное и хроническое, то есть ткани, а подчас и клетки, раз зараженного растения остаются больными в течение всей своей жизни. Вегетативное размножение зараженных кустов приводит к производству больного посадочного материала, а привитая культура винограда увеличивает опасность инфицирования саженцев. В привитых растениях нет преград для передвижения вирусов или бактерий от подвоя к привою или наоборот. Прививка компонентов, потенциальных носителей вирусов или бактерий, уменьшает вероятность получения здорового растения. Кроме этого, при прививке возможны комбинации нескольких вирусов или болезней, последствия которых трудно предвидеть.

Химические меры борьбы с вирусными заболеваниями и бактериальным раком отсутствуют. Наиболее эффективным способом борьбы с хроническими заболеваниями винограда является получение безвирусного и свободного от бактериального рака посадочного материала и закладка им новых плантаций в условиях предупреждения вторичного заражения (3,4,5).

Получение здоровых фитосанитарных клонов представляет собой ряд взаимосвязанных этапов: отбор высокоурожайных бессимптомных кустов, тестирование в течение 3-х лет на вирусоносительство и бактериальный рак, вегетативное размножение и закладка маточника исходных клонов. При такой схеме получение саженцев для закладки производственных маточников возможно только на 12-15 год. Ускорение данного процесса, с использованием современных экспресс методов диагностики, таких как: PCR, иммуноферментный анализ, микрклональное размножение «in vitro», доращивание растений в телице, посадка маточника исходных клонов интенсивного типа, выгонка лозы и производство привитых саженцев, сокращает срок от получения исходных клонов до закладки производственных маточников в 3-4 раза. Таким образом, использование биотехнологических методов в получении фитосанитарных клонов винограда значительно сокращает сроки от начала тестирования до закладки маточников сертифицированным посадочным материалом.

### **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.**

Работы по тестированию на латентную инфекцию вирусных болезней и бактериального рака, а также микрклональное размножение здоровых сортов винограда проводили в лаборатории вирусологии, микробиологии и фитосанитарного контроля.

Объектом исследований служили новые, европейские и автохтонные сорта винограда. Диагностику латентной инфекции вирусных заболеваний проводили

методом Elisa – test (1). Диагностику латентной инфекции бактериального рака осуществляли микробиологическим методом, путем выделения патогена на полуселективную среду Рой Сассер R&S (2). Исходным материалом для введения в культуру «in vitro» служили зелёные побеги здоровых клонов винограда, растущих в теплице лаборатории.

Первоначально экспланты высаживали на агаризованную среду на основе макро- и микросолей Мурасиге и Скуга с модификацией физиологически активных веществ, а дальнейшее микроклональное размножение инициальных растений проводили на искусственном ионитном субстрате Биона 312® (6).

## **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

В целях получения клонов автохтонных, европейских и новых сортов винограда, свободных от вирусных заболеваний и бактериального рака, проведены обследования селекционных участков и промышленных насаждений винограда, для отбора кустов отличающихся хозяйственно-ценными признаками и без внешнего проявления симптомов болезней. Обследования насаждений на наличие вирусов, за период вегетации, осуществляли дважды:

-при первичном обследовании (период цветения винограда) исключали кусты с симптомами следующих вирусных заболеваний: короткоузлия, желтой мозаики, прижилковой мозаики, мозаики арабис, мраморности и болезни «Энации»;

-при вторичном обследовании (созревание ягод) браковали кусты с симптомами вирусных заболеваний: скручивания листьев, желтой мозаики, окаймление жилок, золотистого пожелтения, бороздчатости древесины и бактериального рака.

Таким образом в течение 2012-2015 гг. было отобрано 178 высокоурожайных кустов столовых и технических сортов винограда с хорошим качеством ягод. В результате тестирования, 32 куста (17,98%) оказались латентно инфицированными вирусными заболеваниями и 19 кустов (10,68%) были повреждены латентной формой бактериального рака. Свободными от вирусной и бактериальной инфекции было выделены 78 кустов, наиболее перспективные из которых (в плане хозяйственно ценных признаков) подлежали размножению методом микроклонального черенкования «in vitro». Для этого лоза данных кустов винограда была предварительно нарезана на 2-х глазковые черенки и высажена в горшки с почвенной смесью в условиях теплицы для получения вегетативной массы и последующего введения в культуру ткани.

Материал для введения отбирали в период активного роста побегов и первичные экспланты высаживали в модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга. Дальнейшее микроклональное размножение инициальных растений проводили на питательном субстрате Биона -312®. Для перевода пробирочных растений «in vitro», при достижении ими 4-5 листьев, с пробирок снимали алюминиевые колпачки, после чего в таком состоянии выращивали еще 2-3 недели, до полной их адаптации к комнатным условиям. Адаптированные таким образом растения, впоследствии, высаживали в горшки с почвенной смесью.

Как показали многолетние опыты с разными сортами винограда, использование ионитного субстрата, позволяет решить проблему адаптации пробирочных растений к условиям «in vivo», так как выращивание винограда в таких условиях способствует развитию мощной корневой системы, сильному росту, полной адаптации к внешней среде и как следствие 95-100% приживаемости растений при посадке в почву.

Растения высаженные в почву в ранневесенний период переводятся в теплицу, а в конце мая месяца высаживаются в маточник интенсивного типа. Клоны пересаженные в почву в более позднее время выращиваются в теплице до весны следующего года.

Их лоза используется для производства привитых виноградных саженцев, которыми впоследствии закладываются маточники привойных и подвойных лоз в фермерских питомниководческих хозяйствах.

Использование данной схемы фитосанитарного отбора позволило получить коллекцию клонов винограда, свободных от вирусных заболеваний и бактериального рака, состоящую из 43 клонов 37 сортов, которые выращиваются в настоящее время как в теплице лаборатории, так и на маточнике биологической категории "ПРЕДБАЗИСНЫЙ" общей площадью 3,5 га. Ежегодное ретестирование коллекции и маточника подтверждает их статус: "Свободные от вирусной инфекции и бактериального рака винограда".

Одной из особенностей возбудителя бактериального рака винограда является, то что он может находиться как в растении, так и в почве. Поэтому при закладке плантаций клонами винограда очень важно сохранить их фитосанитарное состояние в течение длительного периода. Для предупреждения вторичного заражения вирусными заболеваниями отбираются участки свободные от нематод-переносчиков вирусов.

В целях разработки метода предупреждения вторичного заражения бактериальным раком было изучено более 250 штаммов бактерий, выделенных из ризосферы корней винограда, пораженного бактериальным раком. В результате изучения их антагонистических свойств к *A. vitis*, отобраны штаммы, проявившие зоны угнетения. Работы в данном направлении продолжаются.

## **ВЫВОДЫ**

Фитосанитарное состояние промышленных насаждений и селекционных участков в Республике Молдова позволяет получить методом отбора здоровые клоны винограда.

В практике фитосанитарной селекции, применение современных методов диагностики вирусных заболеваний и бактериального рака винограда, микроклонального размножения в культуре «in vitro», повышают эффективность селекционного процесса и способствуют более быстрому внедрению в производство выделенных клонов.

Полученные результаты указывают на перспективность применения штаммов-антагонистов для разработки методов, предупреждающих вторичное заражение бактериальным раком.

## **Литература**

1. Clarc M., Adams A., Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.*, 1983, vol.34, p. 476
2. Roy M. And Sasser M., Medium selective *A. tumefaciens* biotype 3, *Phytopatology*, 1983, vol. 73, p.810
3. Sule S., Strategies for the control of agrobacterial disease of grapevine, *In Wine*, 2005, p.44-45
4. Бондарчук В. Вирусные заболевания винограда (распространение, вредоносность, диагностика и меры борьбы), *Institutul Național pentru Viticultura și Vinificație din republica Moldova. Lucrări științifice. Chișinău* 2005, с.208-217
5. Мулюкина Н.А., Вирусные болезни и бактериальный рак винограда, Одесса, 2005, с.148
6. Султанова О., Бондарчук В., Матусевич В., Микроклональное размножение винограда на ионообменном субстрате, Материалы научно-практической конференции, посвященной 75-летию ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, Генетические ресурсы и селекционное обеспечение современного виноградарства, Новочеркасск, 2011, с. 25-31