

УДК 632.3.01/.08:632.938.2

DOI 10.30679/2587-9847-2023-37-107-110

ОЗДОРОВЛЕНИЕ ЧЕРЕНКОВ ВИНОГРАДА МЕТОДОМ ТЕРМОТЕРАПИИ ОТ ВИРУСА GLRaV-3

Котляр В.К., Федорович С.В., Сегет О.Л., канд. с.-х. наук

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Реферат. GLRaV-3 представляет собой системный вирус флоэмы, был обнаружен почти во всех винодельческих регионах мира и несет ответственность за значительный экономический ущерб. Использование здорового материала для размножения имеет решающее значение для борьбы с болезнями виноградной лозы, вызванными вирусами, из-за отсутствия установленного лечения вирусных заболеваний в полевых условиях. В нашем исследовании мы провели серию опытов по термотерапии на черенках винограда, прошедших период покоя с целью определения наиболее эффективного режима оздоровления черенков винограда от вируса GLRaV-3. Полученные нами в ходе этого исследования данные дают представление о том, что самыми эффективными для освобождения посадочного материала от вируса скручивания листьев винограда-3 являются режимы термотерапии с высокой длительностью в сочетании с высокой температурой. Данный метод является хорошей альтернативой химиотерапии или может использоваться вместе с ней для повышения эффективности процесса оздоровления.

Ключевые слова: термотерапия, оздоровление, GLRaV-3, ПЦР в реальном времени

Summary. GLRaV-3 is a systemic phloem virus, has been detected in almost all wine regions of the world and is responsible for significant economic damage. The use of healthy breeding material is crucial for the control of vine diseases caused by viruses, due to the lack of established treatment for viral diseases in the field conditions. In this study, we conducted a series of experiments on thermotherapy on grape cuttings that had passed the dormant period in order to determine the most effective mode of healing of grape cuttings from the GLRaV-3 virus. The data obtained by us in the course of this study give an idea that the most effective for the release of planting material from the curlytop virus of grapes-3 are thermotherapy regimes with a high duration in combination with high temperature. This method is a good alternative to chemotherapy or can be used together with it to increase the effectiveness of the rehabilitation process.

Key words: thermotherapy, rehabilitation, GLRaV-3, real-time PCR

Введение. Вирусные заболевания винограда наносят большой экономический ущерб из-за снижения неравномерности урожая и несбалансированного созревания и даже могут привести к гибели растений. Существует большое количество вирусных агентов виноградной лозы, и некоторые из них оказывают заметное воздействие из-за их глобального распространения, вирулентности и заболеваемости [1].

Заболевания вирусной этиологии провоцируются многими разнообразными вирусными агентами, а в случае культурного винограда (*Vitis vinifera* L.) известно, что он является хозяином более 80 различных видов вирусов [2].

На европейском уровне нормативные акты определяют обязательность тестирования на наличие вируса веерных листьев виноградной лозы (GFLV) и вируса мозаики арабиса

(ArMV) из рода Nepovirus, вирусов 1 и 3, ассоциированных с скручиванием листьев винограда (GLRaV-1 и - 3) рода Ampelovirus [3,4]

GLRaV-3 представляет собой системный вирус флоэмы, был обнаружен почти во всех винодельческих регионах мира и несет ответственность за значительный экономический ущерб. Этот вирус может передаваться полуперсистентным образом мучнистыми червецами (Hemiptera: Pseudococcidae) и щитовками (Hemiptera: Coccidae) [5, 6]

Использование здорового материала для размножения имеет решающее значение для борьбы с болезнями виноградной лозы, вызванными вирусами, из-за отсутствия установленного лечения вирусных заболеваний в полевых условиях. Термотерапия, химиотерапия, культура меристем и соматический эмбриогенез широко используются для элиминации GLRaV-3, но эффективность элиминации варьируется в зависимости от методов [7]. Высокие температуры могут подавлять репликацию вируса или вызывать деградацию вирусной РНК. Кроме того, термотерапия связана с противовирусным механизмом иммунной защиты, называемым сайленсингом РНК. Повышенные температуры индуцируют биогенез вирусной малой интерферирующей РНК (vsiRNA) и ингибируют накопление вирусной РНК, в то время как ключевые гены в пути сайленсинга РНК активируются в кончиках меристем побегов [8]

В нашем исследовании мы провели серию опытов по термотерапии на черенках винограда, прошедших период покоя с целью определения наиболее эффективного режима оздоровления черенков винограда от вируса GLRaV-3.

Объекты и методы исследований. Для идентификации РНК-вируса были отобраны образцы молодых корней и молодых листьев черенков, проросших в воде в течение 3 недель. Всего за период исследований было отобрано более 70 образцов с визуальными признаками вирусной инфекции с сортов селекции ФГБНУ СКФНЦБВ: Гранат, Алькор, Антарис и Красностоп АЗОС. Объектом исследования был вирус GLRaV-3, возбудитель болезни скручивания листьев винограда.

Оздоровление саженцев винограда от вируса, ассоциированного с болезнью скручивания листьев проводится с использованием методов термотерапии [9].

Исходные и обработанные растения проверяются на наличие GLRaV-3 методом ПЦР в реальном времени [10].

Обсуждение результатов. Во всех отобранных нами черенках был идентифицирован вирус GLRaV-3, зачастую в комплексе с вирусами GLRaV-1 и GLRaV-2. 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.

Для предотвращения чрезмерной потери воды и гибели черенков, перед термообработкой все черенки замачивались в чистой воде на 3 часа.

Термообработанные черенки проращивали, а затем отбирали молодые листья для выделения РНК патогена для анализа методом ПЦР в реальном времени на ПЦР-анализаторе LightCycler® 96 (Roche, Китай).

Данный график амплификации (рис.) свидетельствует о том, что в образцах чьи показатели лежат ниже контрольной линии, не было зафиксировано свечения, а следовательно данные образцы освобождены от вируса скручивания листьев после проведения термотерапии.

График амплификации

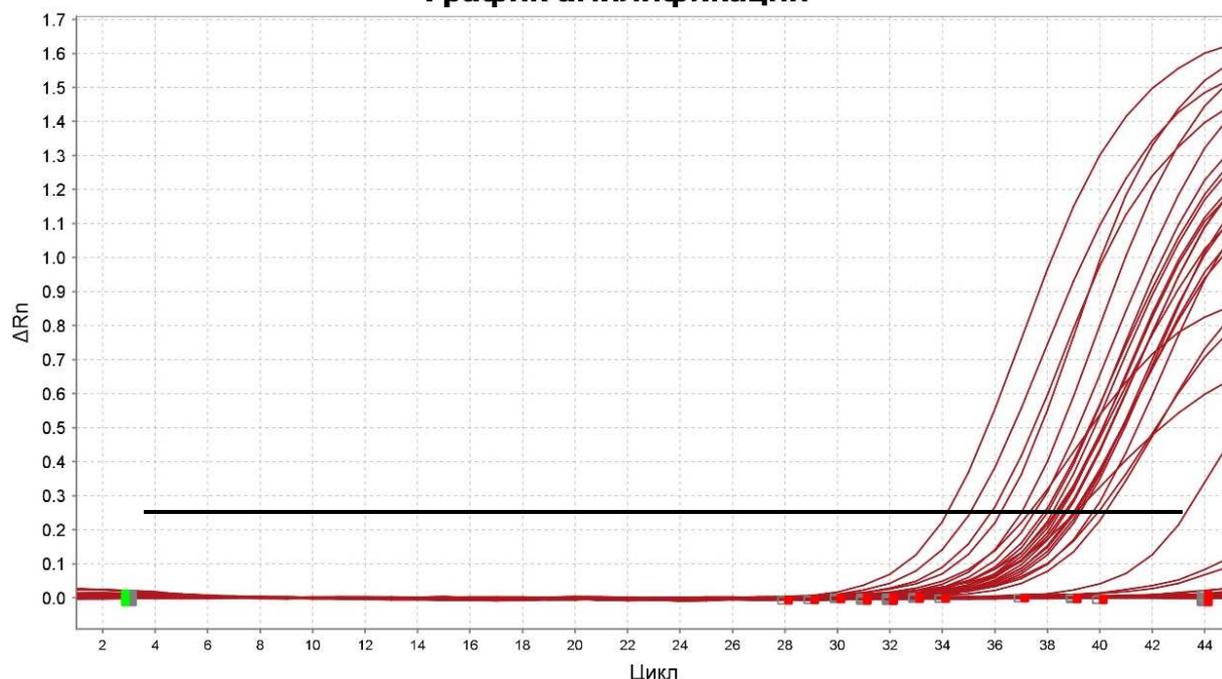


Рис. График амплификации

В табл. отражены результаты проведенной нами серии опытов по термотерапии для освобождения черенков винограда от вируса скручивания листьев (GLRaV-3). 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

Таблица – Результаты оздоровления при различных режимах термотерапии

Градусы (□)	GLRaV-3														
	Время (мин)														
	10			20			30			40			50		
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
45	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Наибольшую эффективность на данной этапе исследований показали следующие режимы: 45 □ в течении 50 минут, 50 □ в течении 50 минут, 55 □ в течении 50 минут, 60 □ в течении 50 минут. Остальные режимы не оказали эффекта на элиминацию вируса скручивания листьев в тестируемых нами черенках, либо показали очень низкую эффективность.

Выводы. Полученные нами в ходе этого исследования данные дают представление о том, что самыми эффективными для освобождения посадочного материала от вируса скручивания листьев винограда-3 являются режимы термотерапии с высокой длительностью (от 45-ти минут) в сочетании с высокой температурой 45-60 °C, данный метод является хорошей альтернативой химеотерапии или может использоваться вместе с ней для повышения эффективности процесса оздоровления, однако метод всё ещё требует доработки и дальнейшего изучения прошедших термотерапию растений, чтобы выяснить каким образом температурный стресс повлияет на дальнейшее развитие саженцев винограда.

Литература

1. Crespo-Martínez, S., Ramírez-Lacunza, A., Miranda, C., Urrestarazu, J., & Santesteban, L. G. Dynamics of GFLV, GFkV, GLRaV-1, and GLRaV-3 grapevine viruses transport toward developing tissues // *European Journal of Plant Pathology*. 2023. DOI: 10.1007/s10658-023-02703-1
2. Fuchs M. Grapevine viruses: A multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard // *Journal of Plant Pathology*. 2020. Vol. 102. P. 643-653. DOI: 10.1007/s42161-020-00579-2
3. OEPP/EPPO. Certification scheme. No. PM 4/8 (2): Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks // *EPPO Bull.* 2008. Vol. 38. P. 422-429.
4. Directive H. A. S. A. T. Council Directive 68/193/EEC of 9 April 1968 on the marketing of material for the vegetative propagation of the vine // *Off. J. L.* 1998. Vol. 93. P. 15–23.
5. Maree H.J. Almeida R. P., Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolja V. V., Burger J. T. Grapevine leafroll-associated virus 3 // *Frontiers in microbiology*. 2013. Vol. 4. 82. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082
6. Le Maguet J. Beuve M., Herrbach E., Lemaire O. Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris* // *Phytopathology*. 2012. Vol. 102, Issue 7. P. 717-723. DOI: 10.1094/PHYTO-10-11-0289
7. Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F. Efficiency of chemotherapy combined with thermotherapy for eliminating grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) // *Scientia Horticulturae*. 2020. Vol. 271. 109462. DOI: 10.1016/j.scienta.2020.109462
8. Miljanić V., Rusjan D., Škvarč A., Chatelet P., Štajner N. Elimination of eight viruses and two viroids from preclonal candidates of six grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) through in vivo thermotherapy and in vitro meristem tip micrografting // *Plants*. 2022. Vol. 11(8). 1064. DOI: 10.3390/plants11081064
9. Производство и сертификация посадочного материала ягодных культур и винограда в России. Контроль качества. Ягодные культуры (метод. указания). М.: ВСТИСП, 2009. Ч. 1. 164 с
10. Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1–5 and 9 // *Journal of virological methods*. 2007. Vol. 141(1). P. 22-29. DOI: 10.1016/j.jviromet.2006.11.035