

## ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА *IN VITRO* ОТ ФИТОПЛАЗМЫ

**Клименко В.П.,** д-р с.-х. наук, **Павлова И.А.,** канд. биол. наук,  
**Володин В.А.,** канд. с.-х. наук, **Гориславец С.М.,** канд. биол. наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Всероссийский национальный научно-исследовательский институт  
виноградарства и виноделия «Магарач» РАН»  
(Ялта)

**Реферат.** В качестве метода оздоровления растений от фитоплазмы применили термическую обработку. Для проведения термотерапии использовали климатическую камеру Binder KBWF 240, в которой культивировали растения винограда *in vitro* сорта Цитронный Магарача в моделируемых условиях, срок лечения –14 дней. Результаты повторного тестирования образцов показали эффективность лечения данного заболевания винограда: из 13 образцов сорта Цитронный Магарача только в одном выявлена латентная форма фитоплазмы почернения древесины винограда *Bois noir*. Для оздоровления растений винограда, полученных в культуре *in vitro*, целесообразно использовать разработанные технологические операции с использованием термотерапии в климатической камере, что позволяет избавить посадочный материал от латентной формы фитоплазмы, ассоциированной с почернением древесины винограда *Bois noir*.

**Ключевые слова:** сорт винограда, *Bois noir*, режим, климатическая камера, термотерапия, эксплант, образец, тестирование

**Summary.** Thermal treatment was used as a method of healing plants from phytoplasma. To carry out thermotherapy, a Binder KBWF 240 climatic chamber was used to cultivate grape plants of ‘Tsitronnyi Magaracha’ variety *in vitro* in simulated conditions during 14 days of treatment period. The results of samples re-testing showed the effectiveness of treatment of this grape disease: only one specimen out of 13 samples of ‘Tsitronnyi Magaracha’ grape variety contained a latent form of phytoplasma of vine wood blackening of *Bois noir*. To heal grape plants *in vitro*, it is advisable to use the developed technological operations using thermotherapy in a climatic chamber, which makes it possible to clear off the planting material from the latent form of phytoplasma associated with grapevine wood blackening of *Bois noir*.

**Key words:** grape variety, *Bois noir*, mode, climatic chamber, thermotherapy, explant, sample, testing

**Введение.** Фитоплазмы распространились во многих странах, нанося серьезный ущерб и вызывая серьезную обеспокоенность в виноградарских хозяйствах и фитопатологических службах. В последние годы достигнуты значительные успехи в диагностике, этиологии и эпидемиологии фитоплазменных болезней [1-3]. Стратегии по снижению распространения фитоплазменных заболева-

ний основаны главным образом на контроле переносчиков посредством опрыскивания инсектицидами, выкорчевывания инфицированных растений и мониторинга санитарного состояния посадочного материала. Контроль болезни золотистого пожелтения (*Grape vine flavescence dorée phytoplasma*) заключается в химической обработке против вектора (*Scaphoideus titanus* Ball.), стратегии, которая не эффективна для сдерживания заболевания почернения древесины винограда (*Bois noir*) из-за заметных отличий в его эпидемиологии [4]. Размножение зараженных растений в питомниках способствует широкому распространению заболеваний в ранее свободных от них виноградарских регионах [5]. Поэтому предпринимаются шаги по разработке протоколов для производства посадочного материала, свободного от фитоплазмы.

Методы культивирования тканей обычно используются для уничтожения вирусов, тем не менее, опубликовано несколько сообщений об их потенциальной способности к элиминации фитоплазмы [6-8]. Эти методы используются как для поддержания патогена в растениях-хозяевах в целях создания коллекции штаммов, так и для устранения фитоплазмы из больных растений. В частности, молекулярные анализы не выявили фитоплазму золотистого пожелтения через 6-9 месяцев культивирования во всех линиях, полученных из пораженных фитоплазмой материнских растений сортов винограда Барбера и Шардоне, в то время как фитоплазма, ассоциированная с почернением древесины винограда, была обнаружена почти в половине размноженных линий [7].

Обработка горячей водой была предложена для лечения от фитоплазмы растительного материала в состоянии покоя [9], однако данная терапия снижает жизнеспособность привитых виноградных саженцев. Методы культивирования ткани, использованные в сочетании с термической обработкой, успешно используются для элиминации вирусов у винограда [10-12], но возможности этих процедур для оздоровления от фитоплазмы изучены гораздо меньше.

Сообщается об эффективности методов культивирования ткани в сочетании с термотерапией для получения саженцев сорта Шардоне без фитоплазмы, ассоциированной с почернением древесины винограда [6]; все исследованные протоколы оказались пригодными для элиминации фитоплазмы, обеспечивая полное оздоровление побегов.

Поскольку пораженные почернением древесины виноградники достаточно широко распространены, борьба с этим заболеванием путем разработки протокола для производства посадочного материала, не содержащего фитоплазмы, стала проблемой первостепенной важности. Цель этого исследования – технологические подходы к оздоровлению сортов и клонов винограда от фитоплазм.

**Объекты и методы исследований.** Место проведения лабораторных исследований: г. Ялта, ФГБУН ВНИИВиВ «Магарач» РАН (лаборатория генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; лаборатория молекулярно-генетических исследований). Материалом для исследования были растения *in vitro* сорта Цитронный Магарача. Образцы данного сорта винограда были введены в условия *in vitro*, размножены согласно разработанной методике [13-15]. Для получения первичного материала одревесневшую лозу проращивали в комнатных усло-

виях. Развившиеся побеги нарезали на 1-2 глазковые экспланты, помещали в бюксы для стерилизации. Стерилизацию осуществляли 96 % этиловым спиртом-ректификатом 40 с диацидом в течение 8 мин с последующей 3-х кратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой в течение 15 минут согласно методике [13]. Экспланты высаживали на модифицированную среду MS (1962), содержащую 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 0,4-0,6 мг/л [14].

Для проведения термотерапии использовали климатическую камеру Binder. Образовавшиеся побеги для укоренения пересаживали на среду  $H_2$ , содержащую 0,08 мг/л  $\alpha$ -нафтилуксунной кислоты (НУК) [15]. Полученные растения размножали посредством микрочеренкования. Растения культивировали на среде  $H_2$  при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 1500 люкс и температуре +27 °С [13].

KBWF 240, в которой культивировали растения винограда *in vitro* сорта Цитронный Магарача в моделируемых условиях, срок лечения –14 дней [16]. В разрабатываемом ранее режиме термотерапии культивировали целые растения.

Образцы проходили тестирование на наличие латентной формы фитоплазмы в лаборатории молекулярно-генетических исследований института «Магарач». Тестирование фитоплазмы «почернение древесины» (*Bois noir*) выполнено методом гнездовой ПЦР со специфичными праймерами для ПЦР 1:FD9f1 и FD9r1. ПЦР 1 – продукты разводили в 1000 раз и проводили ПЦР2 с праймерами: FD9f3b и FD9f3r2. Условия проведения ПЦР 1 и ПЦР 2 выполнено в соответствии с EPPO Bulletin PM7/79 [17, 18].

**Обсуждение результатов.** Результаты предварительного тестирования растений *in vitro* сорта винограда Цитронный Магарача, переданных на испытание, показали наличие в образцах латентной формы фитоплазмы, ассоциированной с почернением древесины винограда (*Bois noir*). После нескольких пассажей на аналогичные среды был отобран материал в количестве 13 образцов для проведения оздоровления.

В качестве метода оздоровления растений от фитоплазмы применили термическую обработку. После двухнедельного культивирования в климатической камере в режиме термотерапии состояние растений было удовлетворительным, побеги сохраняли зеленую окраску, увядания не наблюдалось, корневая система не пострадала (рис. 1).

После термотерапии верхушки растений размером 2-3 см пересаживали на среду  $H_2$  аналогичного состава. Затем из этих растений брали материал для повторного тестирования на наличие фитоплазмы. Результаты повторного тестирования образцов демонстрируют эффективность лечения данного заболевания винограда: из 13 образцов сорта Цитронный Магарача только в одном выявлена латентная форма фитоплазмы почернения древесины винограда *Bois noir* (рис. 2).

Ампликон фитоплазмы почернения древесины винограда выявлен в лунках 3 (тестируемый образец) и 14 – ПК (720 п.н.). Возбудитель почернения древесины выявлен в образце 3 (образец № 10) (табл.).

Полученные в данной работе результаты обнадеживают, во всяком случае, они могут быть проверены дальнейшими исследованиями. Кроме того, еще предстоит оценить, останутся ли оздоровленные образцы бессимптомными.



Рис. 1. Растение сорта Цитронный Магараचा после термотерапии (образец 15)

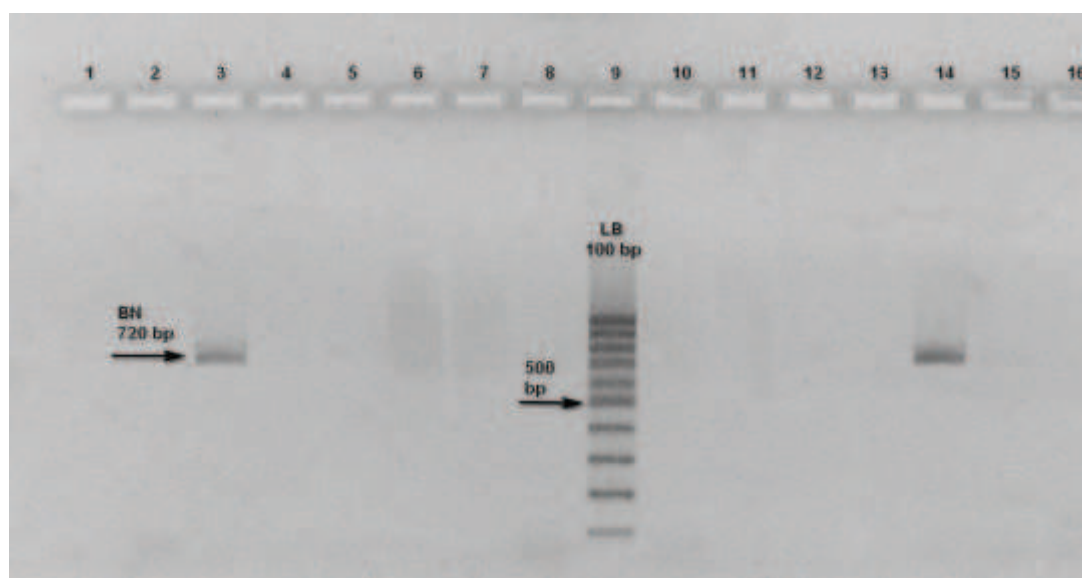


Рис. 2. Электрофореграмма, отражающая результаты повторного тестирования образцов сорта Цитронный Магараचा после термотерапии: № 9 – Lb 100 bp; № 1,2, 10-12 – образцы, у которых возбудитель почернения древесины не выявлен; № 3 – вывден ПЦР ампликон фитоплазмы почернения древесины винограда (720 п.н.); № 14 – положительный контроль (ПК) почернения древесины, BN (720 п.н.); № 15, 16 – отрицательный контроль (ОК)

Гипотеза о том, что фитоплазма золотистого пожелтения не может существенно заражать растения винограда, культивируемые *in vitro*, приводит к идее, что само по себе клональное микроразмножение следует рассматривать как способ оздоровления [7]. Напротив, фитоплазма почернения древесины винограда обнаруживается в процессе микроразмножения, но ее стойкость в культурах *in vitro* должна быть проверена экспериментально. Поэтому желательно располагать дополнительными стратегиями элиминации фитоплазмы.

Результаты лечения фитоплазмы почернения древесины винограда *Bois noir* у растений винограда *in vitro* сорта Цитронный Магарача с использованием термотерапии в климатической камере Binder KBWF 240

Образец	Наличие фитоплазмы почернения древесины винограда <i>Boisnoir</i> до лечения	Наличие фитоплазмы почернения древесины винограда <i>Boisnoir</i> после лечения
Цитронный Магарача № 1	+	-
Цитронный Магарача № 3	+	-
Цитронный Магарача № 4	+	-
Цитронный Магарача № 5	+	-
Цитронный Магарача № 9	+	-
Цитронный Магарача № 10	+	+
Цитронный Магарача № 11	+	-
Цитронный Магарача № 14	+	-
Цитронный Магарача № 15	+	-
Цитронный Магарача № 16	+	-
Цитронный Магарача № 18	+	+
Цитронный Магарача № 20	+	-
Цитронный Магарача № 22	+	-

Исходя из полученных результатов и сообщений других авторов [6, 18], протокол, основанный на культуре ткани в сочетании с термической обработкой с последующим микроразмножением оздоровленных растений, представляется наиболее практичным вариантом для того, чтобы стать рутинным методом производства виноградных саженцев, свободных от фитоплазмы, ассоциированной с почернением древесины винограда, в рамках программ сертификации.

**Выводы.** Таким образом, для оздоровления растений винограда, полученных в культуре *in vitro*, целесообразно использовать разработанные технологические операции с использованием термотерапии в климатической камере, что позволяет избавить посадочный материал от латентной формы фитоплазмы, ассоциированной с почернением древесины винограда *Bois noir*.

#### Литература

1. Диагностика латентной формы фитоплазмы *Bois Noir* на виноградных насаждениях Крыма / В.А. Володин [и др.] // Современные технологии и средства защиты растений – платформа для инновационного освоения в АНК России: материалы межд. научно-практ. конф. (8-12 октября 2018 г.). Санкт-Петербург – Пушкин, 2018. С. 41-43.
2. Boudon-Padieu E. Phytoplasme associés aux jaunisses de la vigne vecteurs potentiels // Bulletin de l'O.I.V. –2005. – V.891/892. – P. 299-309.
3. Marzachi C. Diagnosi molecolare de l'emalattie da fitoplasmide llavite / C. Marzachi, A. Boarino // Informatore Fitopatologico. – 2002. – V.52 (10). – P. 36-41.
4. Maixner M. Grapevine yellows – current developments and unsolved questions //Extended Abstracts,15th Meeting of the International Council for the study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine, Stellenbosch, South Africa, 2006. –2006. –P. 223-224.

5. Mannini F. Hot water treatment and field coverage of mother plant vineyards to prevent propagation material from phytoplasma infections // *Bulletino Insectology*. – 2007. – V.60. – P.311-312.

6. Chalak L. Elimination of Grapevine Bois Noir Phytoplasma by Tissue Culture Coupled or not With Heat Therapy or Hot Water Treatment / L. Chalak, A. Elbitar, N. Mourad, C. Mortada, E. Choueiri // *Advances in Crop Science and Technology*. – 2013. – 1: 107. doi:10.4172/http://dx.doi.org/10.4172/2329-8863.1000107.

7. Gribaudo I. Attempts to eliminate phytoplasmas from grapevine clones by tissue culture techniques / I. Gribaudo, P. Ruffa, D. Cuzzo, G. Gambino, C. Marzachi // *Bulletin of Insectology*. – 2007. – V.60 (2). – P. 315-316.

8. Parmessur Y. Sugarcane yellow leaf virus and sugarcane yellows phytoplasma: elimination by tissue culture / Y. Parmessur, S. Aljanabi, S. Saumtally, A. Dookunsaumtally // *Plant Pathology*. – 2002. – V.51. – P. 561-566.

9. Mannini F. Termoterapia in acqua contro i fitoplasmi dellavite / F. Mannini, C. Marzachi // *Informatore Agrario*. – 2007. – V.24. – P. 62-65.

10. Иванова-Ханина Л.В. Оздоровление посадочного материала винограда от вируса мраморности винограда в культуре *in vitro* // *Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского*. 2019. Т. 71. № 1. С. 23-31.

11. Клименко В.П., Павлова И.А. Оздоровление растений винограда *in vitro* от вирусных болезней // *Русский виноград*. 2018. Т. 7. С. 76-83.

12. Wang M.-R. *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication / M.-R. Wang, Z.-H. Cui, J.-W. Li, X.-Y. Hao, L. Zhao, Q.-C. Wang // *Plant Methods*. – 2018. – 14: 87. Published online 2018 Oct 6. doi: 10.1186/s13007-018-0355-y

13. Деклар. пат. накор. мод. № 14365. Україна. Спосіб отримання рослин винограду від вихідних форм з низькою фертильністю / Павлова І.О., Клименко В.П. – № 10662; Заявл. 11.11.2005 р.; Опубл. 15.05.06, Бюл. № 5.

14. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П.Я. Голодрига [и др.]. Ялта: ВНИИВиПП, 1986. 56 с.

15. Пат. 17919А Україна, МПК 6 А01Н4/00, А01Н1/04. Спосіб вирощування рослин з важкопророщуваного насіння і відборустійких генотипів на рівні зародків / Зленко В.А., Котіков І.В., Трошин Л.П., Павлова І.О. / Україна. - № 95010191; Заявл. 11.01.95; Опубл. 03.06.97, Бюл. № 5. – С. 3.1.18. - 3.1.19.

16. Клименко В.П., Павлова И.А. Оптимизация условий оздоровления, роста и развития растений винограда, полученных с помощью биотехнологических методов // *Сборник научных трудов Института биоэнергетических культур и сахарной свеклы НААН Украины*. 2012. Вып. 16. С. 261-264.

17. Рисованная В.И., Гориславец С.М., Володин В.А. Тестирование латентной стадии фитоплазменной инфекции винограда // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2013. № 4. С. 6-8.

18. Grape vine Flavescence Doree phytoplasma. PM 7/79. EPPO Bulletin, 2007. - № 37. – P. 536-542.

19. Bertaccini A. Termoterapia e chemioterapia per eliminare i fitoplasmi da materiali di moltiplicazione della vite / A. Bertaccini, M. Borgo, L. Bertotto, A. Bonetti, S. Botti, S. Sartori, M. Pondrelli, E. Murari // *L'Informatorio Agrario*. – 2001. – V.42. – P. 137-144.