

Биотехнология в системе оздоровления и размножения комплексно-устойчивых сортов винограда на Юге России

Абдулмалик Батукаев^{1,2}, Диана Палаева², Абузар Батукаев¹

¹ ФГБНУ «Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства», Россия

² ФГБОУ ВО «Чеченский государственный университет имени А.А. Кадырова», Россия

Аннотация. Производство сертифицированного посадочного материала винограда является одной из важнейших проблем в Российской Федерации. Согласно схеме производства оздоровленного посадочного материала винограда, перед введением в культуру *in vitro* исходные растения каждого сорта индивидуально оценивали на типичные сортовые признаки и наличие/отсутствие симптомов заражения вредными организмами. Были отобраны растения винограда с внешними симптомами вирусной инфекции: секторальное покраснение листовой пластинки, короткоузлие, скручивание края листа книзу, изменение окраски листовой пластинки. В качестве исходного экспланта в культуре *in vitro* использовались интенсивно растущие зеленые побеги комплексно-устойчивых сортов винограда Августин, Молдова и Барт, заготовленные с вегетирующих кустов винограда. У исходного растения сорта Августин была отмечена положительная реакция на один из пяти исследуемых вирусов - вирус скручивания листьев винограда (Grapevine Leafroll Virus). Тестирование растений-регенерантов показало, что из 80 растений только у одного растения отмечалась положительная реакция на наличие указанного вируса. Анализ 80 растений клонов сорта Молдова выявил положительную реакцию также у одного растения на вирус желтой мозаики (Grapevine yellow mosaic virus), как и у исходного донорного растения (сорта Молдова). Остальные растения-регенеранты (79 шт.) были абсолютно здоровыми. Доля инфицированных растений от общего числа проанализированных растений составила 1,25%. Растениям, показавшим по результатам тестирования отсутствие вирусов, присваивали категорию «безвирусных» базисных клонов.

1. Введение

Современные российские стандарты на посадочный материал требуют его оздоровления от вирусной инфекции. Все это влечет включение в технологические схемы оздоровления и размножения посадочного материала новых эффективных приемов получения оздоровленного посадочного материала, а также ускоренного его размножения [1, 2, 3, 4]. В связи с этим все большее значение приобретает разработка высокоэффективных технологий производства оздоровленного посадочного материала винограда и ягодных культур с помощью клонального микроразмножения. Данный метод является наиболее приемлемым способом получения большого объема, сертифицированного безвирусного посадочного материала за короткие сроки [2, 5]. Здоровый посадочный материал является основой для получения высоких урожаев [6].

Выпускаемый питомниками посадочный материал должен быть свободным от карантинных объектов и других опасных вредителей, и болезней, поэтому в последние годы всё большее внимание стало уделяться вопросам его сертификации. В действующем в настоящее время национальном стандарте ГОСТ Р 53135-2008 «Посадочный материал плодовых, ягодных, субтропических, орехоплодных, цитрусовых культур и чая. Технические условия» установлены фитосанитарные требования, в том числе по наличию основных вредоносных вирусов. Поэтому сертификационные схемы должны предусматривать оздоровление посадочного материала от экономически значимых вирусов [3].

Процесс оздоровления растений с помощью клонального микроразмножения можно разделить на четыре основных этапа: 1) отбор эксплантов и введение их в культуру; 2), собственно, микроразмножение; 3) укоренение полученных микропобегов; 4) микрочеренкование. На каждом этапе для повышения приживаемости растений оптимизируются условия [1, 7, 8].

Технологии *in vitro* в течение многих десятилетий успешно используются для оздоровления растений от вирусов. Эта технология основана на неравномерном распределении вирусов в молодых тканях апекса побега, где клетки находятся в постоянном и быстром делении [9, 10]. Успех клонального микроразмножения зависит от многих факторов: состава культуральной среды [11, 12], размера и типа вводимых эксплантов, условий культивирования генотипа [13, 14]. Исследователи в области виноградарства по всему миру заняты разработкой и совершенствованием протоколов микроразмножения сортов винограда ценных для производства, селекции, науки [15-19].

Степень приживаемости апикальных меристем на этапе введения в культуру *in vitro* определяется и группой, к которым относятся сорта (сорта столовой и

технической групп): у группы столовых сортов (Августин, Восторг, Мускат итальянский, Ранний Магарача) доля жизнеспособных эксплантов была в среднем по сортам на уровне 50,0 %, а у технических сортов (Подарок Магарача, Виорика, Ркацители) – 40,0–45,0 % [1].

Апикальные меристемы используются для оздоровления растений от сокопереносимых вирусов. При этом очень важное значение имеет размер экспланта: чем меньше его величина, тем больше вероятность получения абсолютно здорового материала. Однако, чем меньше эксплант, тем тяжелее у него проходят регенерационные процессы. Оптимальный размер экспланта может варьировать от 0,2 до 1 мм в зависимости от генотипа [13]. Экспланты характеризуются разной регенерационной активностью в зависимости от типа почек, в которых они находятся (апикальные и пазушные почки; пасынковые (летние) и зимующие почки) [8]. Рост микропобегов из апикальных меристем пасынковых почек у всех исследуемых сортов был активнее, чем при использовании апикальных меристем зимующей почки. Вероятно, такое явление связано с генетической предрасположенностью – пасынковые почки в естественных условиях произрастания имеют более короткий период развития и характеризуются более интенсивным ростом.

2. Материалы и методы

Исследования проведены в лаборатории виноградарства ФГБНУ «Чеченский научно-исследовательский институт сельского хозяйства».

2.1. Отбор исходных эксплантов

В качестве исходного экспланта (меристемы) в культуре *in vitro* использовались интенсивно растущие зеленые побеги винограда сортов Августин, Молдова и Барт, заготовленные с вегетирующих кустов.

Для оценки растений-регенерантов винограда образцы растительного материала формировали согласно стандарту (СТО ВНИИКР 4.007–2011). Проводили визуальный осмотр растений на стадии адаптации и доращивания. От каждого экспериментального образца посадочного материала отбирали не менее 10 растений. При наличии внешних признаков проявления болезни осматривали поле более подробно. Материал хранили при температуре +4°C, переложив на фильтровальной бумагой в полиэтиленовых пакетах с отверстиями для аэрации.

2.2. Метод иммуноферментного анализа

Методом иммуноферментного анализа (ИФА) определяли присутствие вируса *Grapevine Leafroll-Associated Virus - 1* (GLRaV-1) в сортах винограда Августин, Молдова и Барт. Иммуноферментный анализ осуществляли с помощью наборов для

определения вирусных патогенов у растений Nano Diagnostics: Grapevine Leafroll-Associated Virus - 1 (GLRaV-1) - TAS ELISA / Coating Antibody (ООО «Лабораторная диагностика», г. Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Регистрацию результатов анализов выполняли на фотометре для микропланшет Bio-Rad 680(680XR) при длине волны 405 нм (иммунограмма 1).

2.3. Методика ПЦР (полимеразная цепная реакция) анализа

В качестве исходного материала использовали молодые листья винограда. Свежие листья использовались непосредственно для выделения ДНК, либо хранили до использования при -80°C . При взятии образцов в тепличных условиях часть их (повторности) помещается в силикагель и высушивается непосредственно в нем (1г/100 г сырого веса). Выход ДНК рассчитывали на единицу сырого или/и сухого веса материала. Для приготовления растительного гомогената материал предварительно разрезали на мелкие кусочки с помощью скальпеля, затем перетирали в фарфоровой ступке с помощью фарфорового пестика, отбирали приблизительно 100-150 мкл по объему и переносили в пробирки типа Eppendorf (1,5 мл), где интенсивно гомогенизировали в 400 мкл экстракционного буфера ЛБ с помощью гомогенизатора Потера, стараясь его плотно прижимать к стенкам пробирки и максимально минимизировать время гомогенизации (до интенсивного окрашивания в зеленый цвет экстракционного буфера). Далее инкубировали пробы в термостате 40 минут при 65°C .

Исследование специфичности праймерных систем проводили с помощью некоторых видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, также образцы неинфицированных возбудителями фитоплазмозов растений винограда. Для выявления и идентификации *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree* — возбудителя золотистого пожелтения винограда, карантинного вредного

организма для территории России и Северного Кавказа, и *Candidatus Phytoplasma solani Bois noir* — возбудителя почернения коры винограда был применен один из существующих методов диагностики ПЦР «в реальном времени».

3. Результаты исследований

Оценку растений-регенерантов винограда, полученных из апикальных меристем, на наличие вирусов и других патогенных микроорганизмов осуществляли с помощью ПЦР (полимеразная цепная реакция) и иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющих проводить высокочувствительную иммунную диагностику растительного материала на наличие фитопатогенов в короткие сроки. В качестве растительных образцов использовали листья побегов.

Иммуноферментный анализ (ИФА). По результатам ИФА растений-регенерантов винограда на наличие наиболее распространенных вирусов (Grapevine Leafroll-Associated Virus - 1 (GLRaV-1); Grapevine yellow mosaic virus; Grapevine vein banding virus; Grapevine Leafroll Virus; Grapevine stem pitting) у подавляющего большинства исследуемых образцов ответ был отрицательным (таблицы 1).

У исходного растения сорта Августин была отмечена положительная реакция на один из пяти исследуемых вирусов - вирус скручивания листьев винограда (*Grapevine Leafroll Virus*). Тестирование растений-регенерантов его клонов (АГ-56-06; АГ-56-12-1; АГ-56-23-3; АГ-56-31-1) показало, что из 80 растений только у одного (АГ-56-06) отмечалась положительная реакция на наличие указанного вируса. Анализ 80 растений клонов сорта Молдова (МО-126; МО-127; МО-128; МО-129) выявил положительную реакцию у 1 растения (МО-126) на вирус желтой мозаики (*Grapevine yellow mosaic virus*), как и у исходного донорного растения (сорта Молдова). Остальные растения-регенеранты (79 шт.) были абсолютно здоровыми.

Таблица 1. Результаты тестирования экспериментальных образцов посадочного материала винограда сортов Августин, Молдова и Барт методом иммуноферментного анализа (ИФА) на присутствие наиболее распространенных вирусов.

Образец	Вирусы																			
	Grapevine Leafroll-Associated Virus - 1 (GLRaV-1)				Grapevine yellow mosaic virus				Grapevine vein banding virus				Grapevine Leafroll Virus				Grapevine stemm pitting			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Августин (контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
АГ-56-06		-	-	-		-	-	-		-	-	-		+	-	-		-	-	-
АГ-56-12-1		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
АГ-56-23-3		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
АГ-56-31-1		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
Молдова (контроль)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
МО-126		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
МО-127		-	-	-		+	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
МО-128		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
МО-129		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
Барт (контроль)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Б-12		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
Б-26		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-
Б-89		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-

Примечание: 1 – донорные растения (исходные); 2 - Растения in vitro (побеги); 3 – растения после адаптации (регенеранты); 4 – растения в теплице (посадочный материал)

Доля инфицированных растений от общего числа проанализированных растений составила 1,25%. Выявленные инфицированные растения (клоны) винограда изымались и уничтожались. Растениям, показавшим по результатам тестирования отсутствие вирусов, присваивали категорию «безвирусных» базисных клонов. Таким образом, использование меристемных апексов позволило провести оздоровление исходного материала сортов Августин и Молдова от вирусов вирус желтой мозаики (Grapevine yellow mosaic virus) и вируса скручивания листьев (Grapevine Leafroll Virus) в условиях *in vitro*.

Оценку растений–регенерантов винограда сортов Молдова, Августин и Барт на наличие карантинных для территории России и Северного Кавказа фитоплазмозов: возбудителей золотистого пожелтения винограда (*Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree*, FD) и почернения коры (*Candidatus Phytoplasma solani Bois noir*, BN) проводили с помощью ПЦР-анализа. Анализ осуществляли методом ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ) с помощью видоспецифичных праймеров, подобранных на участок 16SrRNA гена для идентификации возбудителей фитоплазмозов

винограда FD и BN. Амплификацию выделенной из растений винограда ДНК и целевых фитоплазм выполняли в режиме ПЦР с электрофоретической детекцией результатов амплификации. Результаты ПЦР-РВ праймеров FDrtF/R и зонда FD-FAM с образцами ДНК фитоплазм. После проведения ПЦР на участок *tuf* гена детектировали фрагменты ДНК искомого размера в 450 пар нуклеотидов (п.н.)

В результате ПЦР- анализа установлено, что в спектре фрагментов исходных генотипов сортов Молдова (дорожки 1-4) и Августин (дорожки 5-8) присутствовали фрагменты ДНК размером 450 п.н., соответствующие *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree*. У сорта Барт (дорожки 9-11) наличие патогенна не выявлено. Анализ спектра фрагментов растений-регенерантов винограда, полученных из апикальных меристем (дорожки 1-4: клоны МО-126; МО-127; МО-128; МО-129) и Августин (дорожки 5-8: клоны АГ 56-02; АГ 56-12-1; АГ 56-23-3; АГ 56-31-1), показал отсутствие фрагмента патогена *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree* (Рисунок 1).

Таким образом, растения-регенеранты винограда, полученные из апикальных меристем, в отличие от исходных сортов Молдова и Августин,

в своем спектре уже не имели фрагментов, соответствующих патогену *Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree*, что подтверждает освобождение исходного растительного материала

от патогенна проходя через культуру изолированных меристемных апексов в условиях *in vitro*.

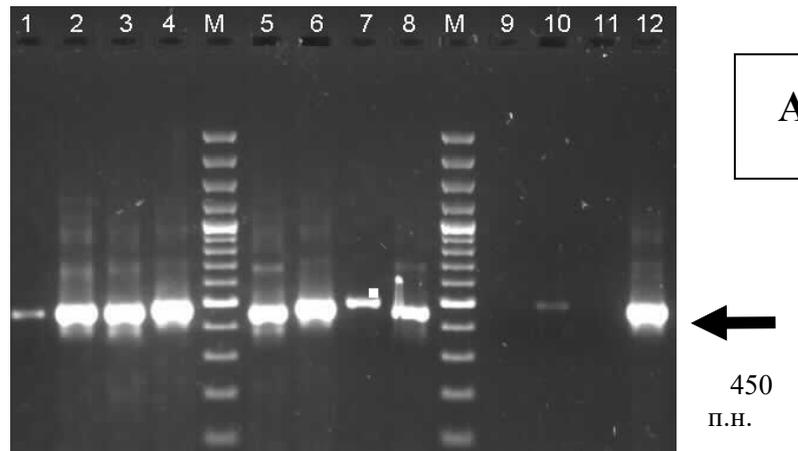


Рисунок 1. Электрофореграммы ПЦР РВ с праймерами FD и BN, М – маркер молекулярного веса 100-3000 пар оснований: А) дорожки: исходные образцы донорных растений винограда (до введения в культуру *in vitro*) 1-4 сорт Молдова; 5-8 сорт Августин; 9-11 сорт Барт; 12 – К (*Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree*); В) дорожки: растения-регенеранты винограда: 1- 4 на основе сорта Молдова (клоны МО-126; МО-127; МО-128; МО-129); 5-8 на основе сорта Августин (клоны АГ 56-02; АГ 56-12-1; АГ 56-23-3; АГ 56-31-1); 9-11 на основе сорта Барт (клоны Н-12; Н-26; Н-89); 12 – К (*Candidatus Phytoplasma vitis Flavescence doree*).

Выявление вирусов Grapevine Fan Leaf Virus (GFLV) и Grapevine Fleck Virus (GFkV) у растений винограда проводили ПЦР в комбинации с ELISA (Immunocapture PCR — с иммунным захватом ПЦР). Анализ осуществляли с помощью набор реагентов для диагностики патогенов растений Nano Diagnostics в формате Immunocapture RT-PCR:

Grapevine Fan Leaf Virus (GFLV) - Immunocapture RT-PCR Kits / ACDcap Immunocapture Kit for RT-PCR и Grapevine Fleck Virus (GFkV) - Immunocapture RT-PCR Kits/ACDamp Immunocapture RT-PCR Kit (ООО «Лабораторная диагностика», г. Москва) в соответствии с инструкцией производителя (Рисунок 2).

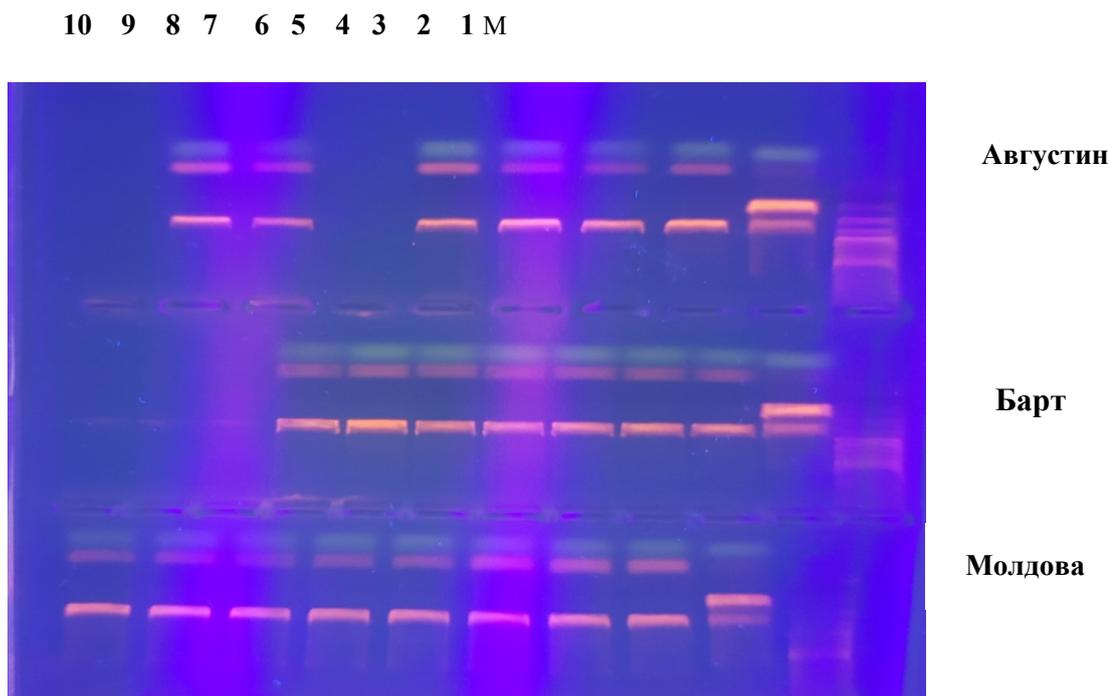


Рисунок 2. Электрофореграмма результатов детекции вирусов Grapevine Fan Leaf Virus (GFLV) и Grapevine Fleck Virus (GFkV) образцах растений-регенерантов винограда сорта Августин клоны АГ 56-02; АГ 56-12-1; АГ 56-23-3; АГ 56-31-1) (верхний ряд, дорожки 3-9), сорта Барт клоны Б-12; Б-26; Б-89 (средний ряд, дорожки 3-8) и сорта Молдова клоны МО-126; МО-127; МО-128; МО-129 (нижний ряд, дорожки 3-10). К+ - положительный контрольные образцы для вирусов GFLV и GFkV (дорожка 2). М- маркер молекулярной массы (дорожка 1).

В результате ПЦР-анализа в образцах растений-регенерантов винограда от сорта Барт (клоны Б-12; Б-26; Б-89), сорта Августин (клоны АГ 56-02; АГ 56-12-1; АГ 56-23-3; АГ 56-31-1); сорта Молдова (клоны МО-126; МО-127; МО-128; МО-129) вирусы *Grapevine Fan Leaf Virus* (GFLV), *Grapevine Fleck Virus* (GFkV), *Grapevine Leafroll-Associated Virus - 1* (GLRaV-1) не были обнаружены. Отсутствие полос на уровне положи тельного контроля для растений-регенерантов подтверждает, что в исследованных

образцах вирусы не обнаружены. В ходе выполнения исследований методами ПЦР-анализа и ИФА протестировано 1347 растений-регенерантов винограда на наличие наиболее распространенных фитоплазмозов и вирусов. Результаты анализов подтвердили отсутствие у них внутренней инфекции. Данным растениям была присвоена категория «безвирусных» базисных клонов (таблица 2).

Таблица 2. Перечень «безвирусных» базисных клонов винограда с подтвержденным оздоровленным статусом методами ПЦР и ИФА.

Исходный сорт	Растения-регенеранты /клоны	Перечень патогенных микроорганизмов	Количество растений, шт.	
Августин	АГ-56-03		12	
	АГ-56-12-1		26	
	АГ-56-23-3		22	
	АГ-56-31-1		22	
	АГ-56-03		22	
	АГ-56-11		86	
	АГ-56-22-3	GFLV	63	
	АГ-56-36-1	GFkV	18	
Молдова	МО-126	GLRaV-1	74	
	МО-127	<i>Gymv</i>	26	
	МО-128	<i>Gvbv</i>	44	
	МО-133	<i>GLV</i>	51	
	МО-126	<i>CPv</i>	11	
	МО-141	Вирус "мозаика резухи"	11	
	МО-148		86	
	МО-151	<i>Flavescence doree ine stemm pitting</i>	45	
	МО-152		22	
	МО-153	<i>CPhytoplasma solani</i>	22	
	МО-154	<i>Bois noir</i>	34	
	МО-155		21	
	Барт	Б-12		22
		Б-26		28
Б-89			28	
Б-111			25	
Б-113			23	
Б-125			63	
Б-126			99	
Б-261			86	
Б-315			25	
Итого	29	10	1117	

4. Выводы

Результатами проведенных исследований подтверждено, что изолирование меристемных апексов винограда в условиях *in vitro* способствует освобождению исходного растительного материала от вирусов и других патогенных микроорганизмов и позволяет с помощью клонального микроразмножения получать выровненный, генетически однородный и оздоровленный посадочный материал. Доля инфицированных растений от общего числа проанализированных растений составила 1,25%. Растениям, показавшим по результатам тестирования отсутствие вирусов, присвоили категорию «безвирусных» базисных клонов. Использование меристемных апексов позволило провести оздоровление исходного материала сортов Августин и Молдова от вируса желтой мозаики (*Grapevine yellow mosaic virus*) и вируса скручивания листьев (*Grapevine Leafroll Virus*) в условиях *in vitro*. Таким образом, с помощью ИФА и ПЦР-анализа подтверждено получение оздоровленного посадочного материала винограда от вирусов и других патогенных микроорганизмов с использованием биотехнологии клонального микроразмножения (*in vitro*).

5. библиографии

1. А. А. Батукаев, Д. Палаева, М. Батукаев, *Monograph, ISBN 978-5-00128-805-3* (2021)
2. М.С. Батукаев, А.А. Батукаев // BIO Web Conf. **103**, 00009 (2024).
3. М. Upadyshev, I. Kulikov, A. Petrova, K. Metlitskaya, V. Donetskikh, *Monograph, M.: FGBNU VSTISP* (2018)
4. Shvets D., Porotikova E., Sandomirsky K., Vinogradova S. *Viruses*, **14**, 6. (2022).
5. А. Батукаев, Д. Палаева, М. Батукаев, Е. Sobralieva. *Advances in Engineering Research*. **151**, P.895-899 (2018)
6. D. Belkina, D. Karpova, E. Porotikova., I. Lifanov, S. Vinogradova. *Viruses*. **15**, 12. p. 2429 (2023)
7. А. Батукаев, М. Mukailov, М. Батукаев, Т. Minkina, S. Sushkova. *Advances in Science, Technology and Innovation*. doi: 10.1007/978-3-030-01683-8_13 pp. 61-63 (2020)
8. N. Doroshenko, V. Puzirnova, L. Troshin. "AFE 2021 - Papers» 022109 (2021)
9. О. Mitrofanova, I.V. Mitrofanova, N.P. Lesnikova-Sedoshenko, N.N. Ivanova // *Works of the State Nikit. Botan. Gard.*, **138**. – pp. 5-56 (2014)
10. J. L. Zhang [et al.] *New Zealand J. of Crop & Horticultural Sci.*, **34**, iss. 3. – pp. 217–223 (2006)
11. J. Karoglan, N. Mirosevic, S. Jelaska. *Vitis*. **29**, p. 466 (1990)
12. J.-P. Peros, L. Torregrosa, G. Berger. *J. of Experimental Botany*. **49**, 319. pp. 171–179 (1998)
13. C. Boiti, L. Garay, G. Reginato. *Vitis*, **32**, pp. 125–126 (1993)
14. M. Eftekhari, M. Alizadeh, K. Mashayekhi, and H. R. Asghari. *Vitis*. – **51** (4), P. 175–182 (2012)
15. M.A. Aazami. *Romanian Biotechnological Letters*, **15**, 3. pp. 5229–5232 (2010)
16. G. Melyan, A. Sahakyan, A. Harutyunyan.
17. *Vitis* **54** (Special Issue), pp. 253–255 (2015)
18. A. Mozafari, O. Ghoraiishi, H. Ghaderi, T. Javadi. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, **81**, 3, pp. 123 – 129 (2016)
19. F.G. Skiada, K. Grigoriadou, E.P. Eleftheriou, *Central European Journal of Biology*, **5**, Issue 6. – pp. 839–852 (2010)
20. A. Batukaev, I. Bamatov, M. Vinter, *Journal of Pharmaceutical Science and Research*, **1**, pp. 59-64 (2018)