

DOI: 10.55505/sa.2023.2.09
UDC: 634.8:631.526.321:581.143.6



METODE DE ASANARE A PROTOCLONELOR DE VIȚĂ-DE-VIE ÎN PROCESUL DE SELECȚIE FITOSANITARĂ

Marcela DUBCEAC^{1*}, ORCID: 0000-0002-7112-6802

¹Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare, Republica Moldova

*Correspondență: Marcela DUBCEAC - e-mail: dubceacm@gmail.com

Abstract. This study addresses the use of hot water therapy, hot air therapy, and *in vitro* culture as additional techniques for eliminating viruses during the phytosanitary selection process of grapevines, aiming to produce healthy plants free from infectious agents. The findings detail the application of these methods to grapevine varieties such as Meleag and Codrinschii, infected with one or more virotic or bacterial pathogens, are presented, highlighting the successful generation of healthy plants after sanitation. Furthermore, the study emphasizes the positive impact of these methods on reducing the time required to obtain phytosanitary clones, thereby enhancing the efficiency of phytosanitary selection in viticulture. The combination of thermotherapy and *in vitro* culture has proven to be effective in clearing grapevines of Grapevine fleck virus (GFKV), Grapevine fanleaf virus (GFLV), and bacterial canker. Plants free from bacterial canker have been obtained from the Meleag variety, while grapevine plants free from GFLV and GFKV viruses have been successfully obtained from Codrinschii variety, facilitating the establishment of a mother plantation in the PREBASIC biological category.

Keywords: *Grapevines; In vitro culture; Phytosanitary selection; Thermotherapy; Clones; Virus free plants; Crown gall.*

Rezumat. În studiul dat au fost abordate termoterapia cu apă fierbinte și termoterapia cu aer fierbinte, precum și cultura *in vitro* ca o tehnică suplimentară pentru eliminarea virusurilor în procesul de selecție fitosanitară a viței de vie pentru a obține plante sănătoase și lipsite de agenți infecțioși. Sunt prezentate rezultatele aplicării acestor metode în cazul unor soiuri de viță-de-vie precum Meleag și Codrinschii infectate cu unul sau mai mulți agenți patogeni de etiologie virotică sau bacteriană, evidențiind succesul obținerii de plante sănătoase după asanare. De asemenea, se subliniază impactul pozitiv al acestor metode asupra scurtării perioadei de obținere a clonelor fitosanitare, contribuind astfel la îmbunătățirea procesului de selecție fitosanitară în tehnologia de obținere a clonelor sănătoase de viță-de-vie. Combinația dintre termoterapie și cultura *in vitro* s-a dovedit a fi eficientă pentru asanarea plantelor de virusurile GFKV, GFLV și cancerul bacterian. Au fost obținute plante libere de cancer bacterian din soiul Meleag și plante de viță-de-vie din soiul Codrinschii libere de virusurile GFLV și GFKV pentru înființarea plantației-mamă de categoria biologică PREBAZA.

Cuvinte-cheie: *Viță-de-vie; Selecție fitosanitară; Cultură in vitro; Termoterapie; Clone; Plante libere de virusuri; Cancer bacterian.*

INTRODUCERE

În domeniul viticulturii, apariția unor noi tipuri de boli cronice ale viței de vie, îmbunătățirea metodelor de diagnosticare și biotehnologia pentru multiplicarea rapidă a clonelor sănătoase sunt tendințe în dezvoltare continuă. Obiectivul principal în acest context este de a dezvolta clone de viță-de-vie cu randament crescut, cu struguri de calitate superioară și lipsite de boli precum cele virale, fitoplasmice și cancerul bacterian, pentru a le putea introduce în plantațiile de producție cât mai rapid posibil. Obținerea de clone de viță-de-vie sănătoase prin selecția fitosanitară reprezintă un proces care implică o serie de etape interconectate, desfășurate în următoarea secvență: selecția prin observare vizuală a tufelor asimptomatice; testarea pentru infecții latente cu boli virale și cancer bacterian; micropropagarea clonelor sănătoase selectate și înființarea unei plantații de reproducere PREBAZA; cultivarea viței-de-vie, producerea butașilor altoiți și înființarea unei plantații de categoria biologică BAZA. Asanarea plantelor de viță-de-vie de agenți infecțioși, ce provoacă boli cronice, este un pas crucial în selecția fitosanitară, pentru a asigura producția de plante sănătoase. Prezența virusurilor, fotoplasmelor și a cancerului bacterian în plantele de viță-de-vie au un impact semnificativ asupra variabilității caracteristicilor agrobiologice ale soiurilor, nu permit plantelor de viță-de-vie să realizeze pe deplin potențialul soiului, reduc rezistența plantelor la factorii negativi de mediu, măresc susceptibilitatea la agenți patogeni, reduc calitatea, atât a portaltoilor, cât și a altoilor, reduc randamentul și calitatea recoltei, precum și capacitatea de depozitare a acesteia. Aceste boli se caracterizează prin natura lor sistemică, prezența infecției în formă latentă, precum și prin lipsa măsurilor directe eficiente de combatere. Pentru a limita răspândirea bolilor sistemice în procesul de multiplicare, este necesar să fie selectat material viticol sănătos, sau să se elimine particulele dăunătoare din clonele selectate înainte de a le include în procesul de multiplicare (Браткова, et al., 2018). Regulamentul privind producerea, certificarea, controlul și comercializarea materialului de înmulțire și a celui săditor viticol stabilește standarde stricte și proceduri pentru a se asigura că materialul viticol destinat multiplicării este sănătos și lipsit de boli. În acest regulament, se specifică cinci boli de etiologie virotică care reprezintă amenințări semnificative pentru viță-de-vie: *GLRaV*, *GFLV*, Cloroză infecțioasă, *Fleck*, *GRSPaV*. În plus, regulamentul menționează cancerul bacterian și îngălbenirea aurie (*Flavescence dorée*) (HG nr. 418 din 09.07.2009).

Este adevărat că unele plante de viță-de-vie pot fi purtătoare de agenți patogeni într-o formă asimptomatică, ceea ce înseamnă că acestea nu prezintă simptome evidente ale bolii. Acest fenomen poate fi influențat de mai mulți factori, cum ar fi concentrația scăzută a agentului infecțios, condițiile climatice nefavorabile pentru manifestarea acestuia sau starea generală de sănătate a plantei. Cu toate acestea, chiar și în absența simptomelor vizibile, plantele asimptomatice pot reprezenta o sursă de infecție și pot contribui la diseminarea bolilor virotice și a cancerului bacterian. În cazul în care protoclonele selectate pentru multiplicare au obținut rezultate pozitive în urma testărilor pentru virusuri și agrobacteria *R. vitis*, este necesar să se aștepte cel puțin un an pentru a identifica alte plante, proces care implică alocarea de timp și resurse materiale suplimentare. Dacă protoclonele selectate sunt valoroase din punct de vedere economic, atunci, pentru a asigura curățarea materialului viticol și eliminarea agenților patogeni, sunt aplicate o serie de proceduri specifice de asanare. *Termoterapia* este cea mai frecventă metodă terapeutică aplicată în protocoale de asanare (Waite & Morton, 2007) : termoterapia cu apă fierbinte și termoterapia cu aer fierbinte, iar, în vederea maximizării eficacității în eliminarea virușilor, cultura *in vitro* este adesea integrată în acest proces. Selecția celei mai potrivite tehnici depinde de tipul de agent patogen, de planta gazdă și de resursele disponibile.

Scopul acestui studiu constă în asanarea protoclonelor de viță-de-vie în cadrul procesului de selecție fitosanitară. Obiectivele acestui studiu includ asanarea protoclonelor de viță-de-vie infectate cu agrobacterii *R. vitis* folosind metoda termoterapiei cu apă fierbinte și cultura *in vitro* și asanarea materialului viticol infectat cu virusuri specifice viței-de-vie prin utilizarea metodei termoterapiei cu aer fierbinte și cultura *in vitro*.

MATERIALE ȘI METODE

În calitate de material biologic au fost utilizate plante de viță-de-vie (*Vitis vinifera* L.) din mai multe soiuri: Meleag, Basarabia, Codrinschii, identificate ca fiind infectate natural cu unul, sau mai multe virusuri. Procesul de evidențiere a protoclonelor a fost efectuat în plantațiile industriale, cât și pe cele de selecție din Republica Moldova. *Testarea pentru virusuri*. Probele pregătite au fost supuse testării pentru prezența virusurilor folosind metoda ELISA-test conform metodei Clark și Adams (1977). Această metodă ne-a permis să detectăm rapid și fiabil virusuri precum GFLV, GLRaV1 și GLRaV3, GFkV și vitivirusul GVA. *Testarea pentru cancer bacterian*. Pentru testarea formelor latente ale cancerului bacterian, a fost folosită metoda microbiologică prin izolarea pe mediul nutritiv Roy & Sasser (1983). *Termoterapia cu apă fierbinte*. Acest proces s-a desfășurat într-un termostat de laborator de tip LP-516, modelul 1387. Coardele au fost fragmentate în segmente a câte 2 ochi, grupate și etichetate, apoi scufundate în rezervor cu apă cu temperatura de 51°C timp de 45 de minute. *Termoterapia cu aer fierbinte*. Metoda dată a fost realizată în camera de creștere cu condiții controlate de tip: KK 500TOP+FIT cu o temperatură de 25°C în timpul zilei și 23°C în timpul nopții, sub o fotoperioadă de 16 ore și o intensitate a luminii de 4000 de lucși. Acestea au fost menținute la $t=38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ timp de 40 de zile. Pentru cultura *in vitro* a fost utilizat mediul Murashige & Skoog (1962) suplimentat cu 1,25 mg/l AIA și 0,5 mg/l 2iP și solidificate cu 4,75 g/l agar, pH ajustat la 6,2.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În prima etapă a procesului, pe parcursul perioadei de vegetație din plantațiile viticole, au fost identificate și selectate tufe care nu prezentau simptome ale bolilor virale și fitoplasmice, dar care se caracterizau printr-un set de caracteristici ampelografice specifice soiului respectiv, precum și prin randament crescut și calitate superioară a strugurilor. În perioada toamnei, după căderea frunzelor, în timpul colectării coardelor de viță-de-vie, tufe care păreau să fie sănătoase, din punct de vedere vizual, au fost supuse unei examinări adiționale pentru a verifica existența sau absența simptomelor de striere a lemnului, scurt-nodare a viței-de-vie și prezența cancerului bacterian.

În etapa a doua, s-a efectuat testarea materialului viticol selectat pentru infecții latente cu boli virale și cancer bacterian. În urma acestor teste, biotipurile care au obținut rezultate negative, precum Basarabia A-36 (33), au fost avansate la etapa următoare a selecției fitosanitare. Cu toate acestea, este notabil de menționat că, de multe ori, așa cum se poate observa în tabelul 1, toate biotipurile selectate dintr-un anumit soi au fost infectate cu unul, sau mai mulți agenți infecțioși simultan. Astfel, protoclona Basarabia A-36 (46) a fost infectată cu un complex de două virusuri: virusul răsucirii frunzelor GLRaV-3 și virusul marmorării frunzelor GFkV. Protoclona Basarabia A-36 (37) a fost infectată cu un complex format din virusul marmorării frunzelor GFkV și o infecție latentă de cancer bacterian (*R. vitis*) (Tabelul 1).

Tabelul 1. Rezultatele testării protoclonelor de viță-de-vie în procesul de selecție fitosanitară

№	Soiul	Adresa	R. vitis	Virusuri				
				GLRaV-1	GLRaV-3	GFLV	GFkV	GVA
1	Meleag	T2-19-25	-	-	-	+	+	-
2	Meleag	T2-19-9	-	-	-	+	+	-
3	Meleag	T2-19-7	+	-	-	-	-	-
4	Basarabia	A-36 (33)	-	-	-	-	-	-
5	Basarabia	A-36 (46)	-	-	+	-	+	-
6	Codrinschii	I-9-1-3		-	-	-	+	+
7	Codrinschii	I-9-7-4	-	-	-	+	+	-
8	Codrinschii	I-9-8-1	-	-	-	-	+	-
9	Codrinschii	I-11-6-1	+	-	-	-	+	-
10	Codrinschii	I-10-7-5	-	+	-	-	+	-

Plantele din soiul Meleag cu adresa T2-19-25 și T2-19-9 au fost testate pozitiv la două virusuri: *GFLV* și *GFkV*. În plus, un alt biotip, Meleag T2-19-7, a prezentat o infecție cu cancer bacterian. De asemenea, au fost identificate trei biotipuri de Codrinschii care au fost testate pozitiv pentru două virusuri diferite: I-9-1-3, I-9-7-4, I-10-7-5, în timp ce alte două biotipuri de Codrinschii au fost confirmate ca având infecție cu un singur virus, I-9-8-1 (*GFkV*), sau cu un singur virus și agrobacteria *R. vitis*, I-11-6-1. Astfel, protoclona de viță-de-vie a soiului de masă Basarabia A-36 (33), care a obținut rezultate negative în ceea ce privește testarea pentru boli virale și cancer bacterian, a fost considerată liberă de aceste boli și transferată la etapa de multiplicare. Protoclonele soiurilor Codrinschii și Meleag, care au fost infectate cu boli virale și cancer bacterian, au fost supuse procedurilor de asanare. În procesul de obținere a clonelor sănătoase din soiurile Meleag și Codrinschii au fost utilizate metode de asanare precum termoterapia și cultura *in vitro*. Pentru soiul Meleag a fost selectată protoclona cu adresa T2-19-7, care prezenta o infecție cu cancer bacterian, și supusă tratării prin metoda terapiei cu apă fierbinte, cât și cultura *in vitro* pentru asanarea acesteia. În cazul soiului Codrinschii, a fost aleasă planta cu adresa I-9-7-4, care a fost asanată prin metoda terapiei cu aer fierbinte, inclusiv și cultura *in vitro*.

Asanarea protoclonei de viță-de-vie infectată cu cancer bacterian prin metoda terapiei cu apă fierbinte

Pentru asanarea protoclonei Meleag T2-19-7, testată pozitiv la forma latentă a cancerului bacterian (*R. vitis*), în procesul de selecție fitosanitară a fost aplicată metoda terapiei cu apă fierbinte. În urma cercetărilor anterioare, s-a constatat că utilizarea tratamentului cu apă fierbinte la o temperatură de 51°C (Бондарчук et al., 2011; Дубчак et al., 2020) nu a avut niciun efect asupra dezvoltării butașilor de viță-de-vie și a viabilității ochiurilor (Figura 2). În acest scop, coardele au fost inițial acclimatizate la temperatura camerei timp de 24 de ore, apoi fragmentate în segmente a câte 2 ochi, grupate și etichetate, apoi scufundate în rezervor cu apă cu temperatura de 51°C timp de 45 de minute (Figura 1). După termoterapia cu apă fierbinte coardele au fost prelucrate cu parafină și plantate în vase de vegetație cu substrat nutritiv pentru a fi înrădăcinate.



Figura 1. Asanarea coardelor de viță-de-vie prin metoda terapiei cu apă fierbinte.



Figura 2. Coardele de viță-de-vie peste 14 zile după plantare.

Trebuie remarcat că pentru a suprima infecția cu cancer bacterian în viță-de-vie, folosind metoda de asanare cu apă caldă, este suficient să se efectueze tratamentul la o temperatură de 50°C timp de 30 de minute (Bazzi et al., 1991). Având în vedere că în prezent bolile viței-de-vie cu etiologie fitoplasmatică sunt larg răspândite în plantațiile viticole din Republica Moldova (Хайстров, 2020), creșterea temperaturii la 51°C și prelungirea duratei tratamentului la 45 de minute permite să suprimă și posibila prezență a agenților infecțioși responsabili de bolile cu etiologie fitoplasmatică.



Figura 3. Plantele de viță-de-vie multiplicare prin cultura *in vitro*.

Toamna, după căderea frunzelor, au fost testate toate plantele de viță-de-vie care trecuseră prin procesul de termoterapie cu apă fierbinte pentru prezența bacteriei *R. vitis*, și toate probele au dat rezultate negative. În luna februarie 2023, vasele de vegetație au fost transferate din seră într-o cameră climaterică cu posibilitatea de reglare a factorilor climatici: temperatura la 25°C / 23°C (zi / noapte) sub o fotoperioadă de 16 ore, pentru a stimula creșterea activă a lăstarilor. Odată ce a fost obținută masa vegetativă necesară, a început procesul de multiplicare a protoclonei Meleag T2-19-7 prin metoda de micropropagare *in vitro*. Rezultatul a constat în obținerea a 100 de plante lipsite de cancer bacterian (Figura 3).

Asanarea materialului viticol infectat cu GFLV și GFKV prin utilizarea metodei termoterapiei cu aer fierbinte

Metoda de tratare termică cu aer fierbinte constă în următoarele: plantele sunt înrădăcinate în ghivece cu substrat nutritiv și plasate în camere termice speciale cu o temperatură controlată. Temperatura este ridicată treptat cu 3-4°C la fiecare 3-4 zile până la temperatura de +38°C ±1. Se consideră că tratamentul termic este mai eficace împotriva virusurilor care se găsesc în țesutul parenchimatic, cum ar fi nepovirusurile (Gribaudo, 2006). De fapt, virusul Scurt-nodării (GFLV) a demonstrat o susceptibilitate semnificativă la stresul termic în diverse specii de *Vitis* (Panattoni & Triolo, 2010).

Astfel, pentru a asana biotipul din soiul Codrinschii cu adresa I-9-7-4, infectat cu

GFLV și Fleck, a fost aplicată metoda termoterapiei cu aer fierbinte. Coardele plantei au fost fragmentate în segmente, fiecare având câte 2 ochi, iar vasele de vegetație au fost transferate într-o cameră climaterică, unde se controla cu precizie factorii climatici.

Când lăstarii au fost înrădăcinați și au atins o lungime de 4-5 internoduri, temperatura din camera climaterică a fost crescută treptat cu 3°C la fiecare trei zile, pentru a evita șocurile de temperatură. Pentru a proteja sistemul radicular de supraîncălzire, vasele au fost acoperite cu o folie protectoare. Temperaturile finale zi/noapte au fost stabilite la 38°C ±1°C și au fost menținute timp de 40 de zile (Figura 4). După această perioadă, porțiunile apicale ale lăstarilor au fost prelevate, supuse unei sterilizări la suprafață și, ulterior, cultivate în eprubete pe mediul nutritiv solidificat cu agar (Figura 5).



Figura 4. Lăstarii de viță-de-vie după 40 de zile de termoterapie cu aer fierbinte.



Figura 5. Vitroplantulă de viță-de-vie înrădăcinată pe mediu agarizat.

Eprubetele cu explante inoculate au fost transferate în camera culturală pentru o perioadă de 40 de zile. După această perioadă, o parte din vitroplante au fost testate pentru prezența virusurilor GFLV și GFkV folosind metoda ELISA, iar rezultatele au indicat 100% rezultate negative pentru ambele virusuri. Astfel, au fost obținute 110 plante înrădăcinate din soiul Codrinschii. Aceste plante au fost ulterior crescute și fortificate în condiții de seră, iar apoi au fost transplantate în plantația-mamă de categorie biologică PREBAZA (Figura 6).



Figura 6. Plantația-mamă de categoria biologică PREBAZA.

CONCLUZII

Utilizarea metodei de asanare cu apă fierbinte la o temperatură de 51°C timp de 45 de minute, în combinație cu cultura *in vitro*, a reprezentat o abordare eficientă și reușită pentru eradicarea infecției cu cancer bacterian (*R. vitis*) la protoclona de viță-de-vie din soiul Meleg. Rezultatul s-a materializat în obținerea a 100 de plante sănătoase.

Metoda de tratare termică cu aer fierbinte la o temperatură de 370C timp de 40 de zile, asociată cu cultura *in vitro*, a demonstrat eficacitate în eliminarea agenților patogeni din protoclona de viță-de-vie din soiul Codrinschii, care era infectată cu virusurile scurt-nodării și marmorării frunzelor de viță-de-vie. Au fost obținute 110 plante și ulterior plantate în plantația-mamă de categorie biologică PREBAZA. Această combinație de tehnici, termoterapia și cultura *in vitro*, s-a dovedit a fi efectivă pentru asanarea protoclonelor de viță-de-vie în procesul de selecție fitosanitară.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

1. BAZZI, C., STEFANI, E., GOZZI, R., BURR, T.J., MOORE, C.L., ANACLERIO, F. (1991). Hot-water treatment of dormant grape cuttings: its effects on *Agrobacterium tumefaciens* and on grafting and growth of vine. In: *Vitis*, vol. 30, pp. 177-187. Available: <https://doi.org/10.5073/vitis.1991.30.177-187>
2. BURR, T.J., BAZZI, C., SÜLE, S., OTTEN, L. (1998). Crown Gall of Grape: Biology of *Agrobacterium vitis* and the Development of Disease Control Strategies. In: *Plant Disease*, vol. 82(12), pp. 1288-1297. ISSN 1943-7692. Available: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1288>
3. CLARK, M.F., ADAMS, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. In: *Journal of General Virology*, vol. 34 (3), pp. 475-483. Available: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>
4. GRIBAUDO, I., GAMBINO, G., CUOZZO, D., MANNINI, F. (2006). Attempts to eliminate Grape - vine rupestris stem pitting associated virus from grapevine clones. In: *Journal of Plant Pathology*, vol. 88, pp. 293-299.
5. PANATTONI, A., TRIOLO, E. (2010). Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. In: *Scientia Horticulturae*, vol.125 (1), pp. 63-67. Available: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.001>
6. ROY, M., SASSER, M. (1983). A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. In: *Phytopathology*, vol. 73, p. 810.
7. Hotărârea Guvernului RM cu privire la aprobarea Regulamentului privind producerea, certificarea, controlul și comercializarea materialului de înmulțire și săditor viticol: nr. 418 din 09.07.2009. In: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova*, 2009, nr. 112-114, art. 480. Disponibil: https://www.legis.md/cautare/getResults?doc_id=14154&lang=ro
8. WAITE, H., MORTON, L. (2007). Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material. In: *Phytopathologia Mediterranea*. vol. 46, pp. 5-17.
9. БРАТКОВА, Л.Г., ЦАЦЕНКО, Н.Н., МАЛЫХИНА, А.Н. и др. (2018). Ускоренное получение высококачественного посадочного материала винограда при помощи биотехнологии IN VITRO. In: *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*, № 6 (74), с. 70-73.
10. БОНДАРЧУК, В., СУЛТАНОВА, О., ХАУСТОВ, Е., ДАДУ, Д. (2014). Оздоровление виноградной лозы от *Agrobacterium vitis* (var *tumefaciens*) методом термотерапии. In: *Pomicultura, Viticultura și Vinificația*, nr. 6 (54), pp. 27-29. Disponibil: https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/27-29_14.pdf
11. ДУБЧАК, М.В., ХАУСТОВ, Е.И., СУЛТАНОВА, О.Д., БОНДАРЧУК, В.В. (2020). Горячая водная терапия в фитосанитарной селекции винограда. В: *Русский виноград*, том 13, с. 16-24. ISSN 2712-8245. DOI 10.32904/2412-9836-2020-13-16-24.
12. ХАУСТОВ, Е.И., ДУБЧАК, М.В., БОНДАРЧУК, В.В. (2020). Почернение древесины-фитоплазменное заболевание винограда в Республике Молдова. В: *Русский виноград*, том: 13, с. 33-40.

Conflict of Interests

No competing interests were disclosed.

Paper history

Received 6 November 2023; Accepted 5 December 2023

Copyright: © 2023 by the author(s). This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0).