

Биотехнологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от возбудителей бактериального рака

Клименко В.П., Лушчай Е.А.[✉], Павлова И.А., Абдурашитова А.С., Зленко В.А., Григоренко М.И., Спотарь Г.Ю., Корнильев Г.В., Рязанкина Я.Ю.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, г. Ялта, Республика Крым, Россия

[✉]biogen@magarach-institut.ru

Аннотация. Целью исследования является получение новых знаний в ходе проведения биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от возбудителей бактериального рака для их последующего практического применения. Объект исследования – культивирование растений винограда *in vitro*, инфекционные болезни, оздоровление растительного материала. Получены растения *in vitro* 18 сортов винограда в необходимом и достаточном количестве для проведения экспериментов по оздоровлению. Проведены комплексные технологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от бактериального рака, включая термотерапию и электротерапию. Осуществлена молекулярная диагностика латентной формы фитопатогенов в растительном материале после процедур оздоровления. Регенерацию после процедур оздоровления в степени, достаточной для проведения тестирования, прошли образцы 5 сортов винограда. Полностью удалось элиминировать инфекцию *A. tumefaciens* в образцах сортов Аврора Магарача и Ркацители Магарача и *A. rhizogenes* в образцах сортов Альминский и Цитронный Магарача. В значительной степени снизился уровень бактериальной инфекции *A. tumefaciens* в образцах сорта Памяти Голдриги. Растительный материал сорта Цитронный Магарача пока не удалось избавить от инфекции *A. tumefaciens*. Проведенные эксперименты показали, что использование биотехнологических методов позволяет элиминировать инфекцию или в значительной степени снизить ее уровень в отношении *A. rhizogenes* и *A. tumefaciens*. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований. Результаты выполнения работы могут быть использованы для оздоровления растений в научных экспериментах и в производстве посадочного материала винограда для создания насаждений высоких биологических категорий качества. В дальнейшем предполагается разработать оптимальную схему оздоровления посадочного материала винограда от основных инфекций.

Ключевые слова: фитопатогены; элиминация; тестирование; *in vitro*; термотерапия; электротерапия.

Для цитирования: Клименко В.П., Лушчай Е.А., Павлова И.А., Абдурашитова А.С., Зленко В.А., Григоренко М.И., Спотарь Г.Ю., Корнильев Г.В., Рязанкина Я.Ю. Биотехнологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от возбудителей бактериального рака // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2024;26(3):247-252. EDN HLYHEG.

ORIGINAL RESEARCH

Biotechnological operations for the recovery of grape plant material from *Agrobacterium* biovars

Klimenko V.P., Lushchay E.A.[✉], Pavlova I.A., Abdurashitova A.S., Zlenko V.A., Grigorenko M.I., Spotar G.Yu., Korniliev H.V., Ryazankina Ya.Yu.

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking Magarach of the RAS, Yalta, Republic of Crimea, Russia

[✉]biogen@magarach-institut.ru

Abstract. The aim of this research was to obtain new knowledge during biotechnological operations for the recovery of grape plant material from *Agrobacterium* spp. pathogens for subsequent practical use. Study object included cultivating grape plants *in vitro*, infectious diseases, and recovery of plant material. The plants *in vitro* of 18 grape varieties were obtained in the necessary and sufficient quantity to carry out the experiments on recovery. The complex of technological operations for the recovery of grape plant material from *Agrobacterium* spp. was carried out, including thermotherapy and electrotherapy. After the recovery procedures, molecular diagnostics of the latent form of phytopathogens in plant material were performed. Samples of 5 grape varieties were regenerated after recovery procedures to a degree sufficient for testing. The infection of *A. tumefaciens* in samples of 'Aurora Magarach' and 'Rkatsiteli Magarach' varieties, as well as the infection of *A. rhizogenes* in samples of 'Alminski' and 'Tsitronnyi Magarach' varieties, was completely eliminated. The level of *A. tumefaciens* infection was significantly reduced in the samples of 'Pamyati Golodrigi' variety. Plant material of 'Tsitronnyi Magarach' variety was not relieved of *A. tumefaciens* infection. The conducted experiments show that the use of biotechnological methods makes it possible to eliminate the infection of *Agrobacterium* spp. pathogens *A. rhizogenes* and *A. tumefaciens*, or significantly reduce the level of infection. The data obtained are the basis for further research. The results of work can be used for plant recovery in scientific experiments and in the production of grape plant material in order to create the vineyards of high biological quality categories. Further on, it is planned to develop an optimal scheme for the recovery of grape planting material from basic infections.

Key words: pathogens; elimination; testing; *in vitro*; thermotherapy; electrotherapy.

For citation: Klimenko V.P., Lushchay E.A., Pavlova I.A., Abdurashitova A.S., Zlenko V.A., Grigorenko M.I., Spotar G.Yu., Korniliev H.V., Ryazankina Ya.Yu. Biotechnological operations for the recovery of grape plant material from *Agrobacterium* biovars. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2024;26(3):247-252. EDN HLYHEG (in Russian).

Введение

Наблюдаемые в последние десятилетия изменения погодно-климатических условий, недостаточное использование современных агротехнических

приемов и селекционно-генетических достижений, закладка виноградников импортным, зачастую инфицированным посадочным материалом дестабилизируют производство винограда и существенно увеличивают потери урожая от болезней и вредителей [1]. Несмотря на то, что используемые сегодня

пестициды обеспечивают эффективную защиту от многих заболеваний, распространение некоторых возбудителей болезней невозможно контролировать традиционными химическими методами. Общая характерная черта этих фитопатогенов – это то, что они являются системными и в основном бессимптомно присутствуют в растениях-хозяевах из-за низкого уровня исходной концентрации в растении, неблагоприятных условий окружающей среды или защитных реакций растения [2]. Бессимптомная системная инфекция *Agrobacterium* spp. – явление, распространенное у винограда [3]. Патоген генетически трансформирует клетки растения-хозяина, что приводит к росту опухоли. Перенос сегмента бактериальной ДНК (Т-ДНК) от бактерии к ядру клетки растения-хозяина в основном управляется бактериальными генами, тогда как его интеграция в геном растения-хозяина определяется генами растения [4]. Бактериальный рак, вызываемый агробактериями, является одним из наиболее серьезных заболеваний винограда, для которого до сих пор не разработаны методы эффективного контроля развития [5]. Срок эксплуатации виноградных насаждений во многом лимитируется интенсивностью развития бактериального рака, ухудшение агробиологических и хозяйственных показателей связано с уменьшением объема проводящей системы из-за некроза сосудов и увеличением расхода пластических веществ на рост раковой опухоли, что приводит к постепенному истощению растения и его гибели [6]. Агробактерии распространяются при использовании инфицированного посадочного материала, а также посредством почвы, содержащей зараженные остатки виноградной лозы [7–9]. На миграцию *Agrobacterium* на виноградниках влияет ряд факторов, в том числе обрезка и другие агротехнические мероприятия, орошение, давление воды в почве, которое может воздействовать на перемещение бактерий по ксилеме [10]. Использование для размножения растительного материала, оздоровленного от латентных инфекций, является ключевым фактором в предотвращении развития и распространения болезней. Оздоровленный посадочный материал необходим для последующего размножения в питомниках и для обмена зародышевой плазмой между странами или регионами [11–14]. Изучение особенностей экономически важных фитопатогенов позволяет развить биотехнологические методы оздоровления растений винограда от связанных с ними заболеваний, в том числе от биоваров бактериального рака [15–17].

Основная цель данной работы – получение новых знаний в ходе проведения биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от возбудителей бактериального рака для их последующего практического применения.

Объект исследования – культивирование растений винограда *in vitro*, инфекционные болезни, оздоровление растительного материала.

Материалы и методы исследования

Место проведения лабораторных опытов: лаборатория генетики, биотехнологий селекции и раз-

множения винограда; лаборатория молекулярно-генетических исследований (ФГБУН «ВНИИВИВ «Магарач» РАН», г. Ялта), исследования проведены в 2022–2023 гг.

Материалом для экспериментов являлись растения *in vitro* 18 межвидовых сортов винограда. В основу получения, культивирования и клонального микро-размножения растений винограда положены разработки института «Магарач» [18]. Методы оздоровления растений винограда *in vitro* используются согласно рекомендациям, опубликованным в печати [19].

В работе использованы следующие среды: MS – питательная среда Murashige, Skoog (1962); M₁ – модифицированная среда MS Голодрига, Зленко (1986); M₂ – модифицированная среда MS Голодрига, Зленко (1986); PG – питательная среда Plant Growth (1993).

Исходным материалом для исследования является однолетняя виноградная лоза, заготовленная с визуально здоровых кустов на Ампелогографической коллекции института «Магарач» и на селекционных участках. Для получения эксплантов черенки проращивали в стеклянных сосудах с водопроводной водой в комнатных условиях (20–22 °С, влажность 60–65 %). Образовавшиеся зеленые побеги отсекали, удаляли листья, разрезали на одно-двухглазковые экспланты и помещали в стеклянные биксы. Операции по стерилизации материала и дальнейшим посадкам на питательные среды проводили в ламинарном боксе. Стерилизацию осуществляли 96 %-ным этиловым спиртом-ректификатом в течение 40 с и диоксидом в течение 8 мин. с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой в течение 15 мин. После механических операций экспланты высаживали в культуральные сосуды на модифицированную среду MS, дополненную 6-бензиламинопурином в концентрации 0,4 мг/л. Для укоренения образовавшиеся побеги пересаживали на среду PG, содержащую α-нафтилуксусную кислоту в концентрации 0,05 мг/л. Культивирование осуществляли на свету при 16-часовом фотопериоде интенсивностью 1500 люкс и температуре 27 °С.

Экстракцию ДНК выполняли с использованием экстрагирующего буфера ЦТАБ [20]. Исследование патогенов бактериальной этиологии проводили методом биоПЦР в два этапа: микробиологический – для получения накопительных культур при тестировании бактериального рака *Agrobacterium* spp., и молекулярный – ПЦР. На заключительном этапе исследования для детекции результатов по бактериальному раку применяли метод гель – электрофореза продуктов ПЦР в 1,2–1,4 %-ном агарозном геле согласно стандарту организации 01580301.031-2021 «Виноград, плодовые, орехоплодные, ягодные, декоративные культуры, вода и почва. Определение бактериальных фитопатогенов на основе полимеразной цепной реакции».

По схеме оздоровления с помощью термотерапии применяли климатическую камеру Binder KBWF 240. Если в предыдущих работах термотерапию проводили на протяжении 284 ч, то в данной работе время культивирования растений в климатической камере состав-

ляло 624 ч; после выполнения основного программного цикла совершали дополнительные процедуры без начальных стадий с низкими температурами. Всего термотерапия осуществлена на образцах 11 сортов.

По схеме оздоровления с помощью электро-терапии применяли камеру горизонтального электрофореза Mini-135. В процессе электро-терапии исследовали до пяти вариантов воздействия электрическим током: 0 (контроль), 30 мА, 40 мА, 50 мА и 100 мА на протяжении 20 мин. Для электро-терапии использованы зеленые побеги четырех сортов винограда. После процедуры экспланты вводили в условия *in vitro*.

Опыты проводили как минимум в трехкратной повторности. Различия между вариантами считали статистически значимыми при уровне достоверности $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Введенные в культуру в 2022–2023 гг. экспланты 18 сортов винограда использованы для размножения и получения материала в необходимом для экспериментов по оздоровлению количестве.

При первичном тестировании все испытываемые образцы проанализированы на наличие фитопатогенов бактериальной природы, а именно: биовар *Agrobacterium tumefaciens*, биовар *Agrobacterium vitis*, биовар *Agrobacterium rhizogenes*.

По результатам ПЦР в образцах сортов Аврора Магарача, Красень, Памяти Голодриги, Подарок Магарача, Рислинг Магарача, Ркацителы Магарача, Спартанец Магарача, Тавквери Магарача, Цитронный Магарача и Ялтинский бессемянный выявлен биовар *A. tumefaciens* (табл. 1). В образцах сортов Альминский, Сафьяновый, Спартанец Магарача, Подарок Магарача и Цитронный Магарача выявлен биовар *A. rhizogenes*. При этом образцы сортов Подарок Магарача, Спартанец Магарача и Цитронный Магарача инфицированы двумя биоварами, *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Все проанализированные образцы оказались свободными от патогенного биовара *A. vitis*.

Поскольку по результатам первичного тестирования образцы сортов Антей магарачский, Артек, Геркулес, Гранатовый Магарача, Первенец Магарача и Южнобережный оказались свободными от *Agrobacterium* spp., то эти сорта к дальнейшим работам по оздоровлению от бактериальной инфекции не привлекались, материал поддерживается в условиях *in vitro*.

Таблица 1. Результаты первичной молекулярной диагностики латентной стадии возбудителей бактериального рака в растительном материале винограда

Table 1. The results of primary molecular diagnostics of the latent stage of *Agrobacterium* spp. in grape plant material

Сорт винограда	Биовары бактериального рака <i>Agrobacterium</i> spp.		
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium vitis</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Аврора Магарача	+	-	-
Альминский	-	-	+
Антей магарачский	-	-	-
Артек	-	-	-
Геркулес	-	-	-
Гранатовый Магарача	-	-	-
Красень	+	-	-
Памяти Голодриги	+	-	-
Первенец Магарача	-	-	-
Подарок Магарача	+	-	+
Рислинг Магарача	+	-	-
Ркацителы Магарача	+	-	-
Сафьяновый	-	-	+
Спартанец Магарача	+	-	+
Тавквери Магарача	+	-	-
Цитронный Магарача	+	-	+
Южнобережный	-	-	-
Ялтинский бессемянный	+	-	-

Примечания: «+» – наличие фитопатогена, «-» – отсутствие фитопатогена

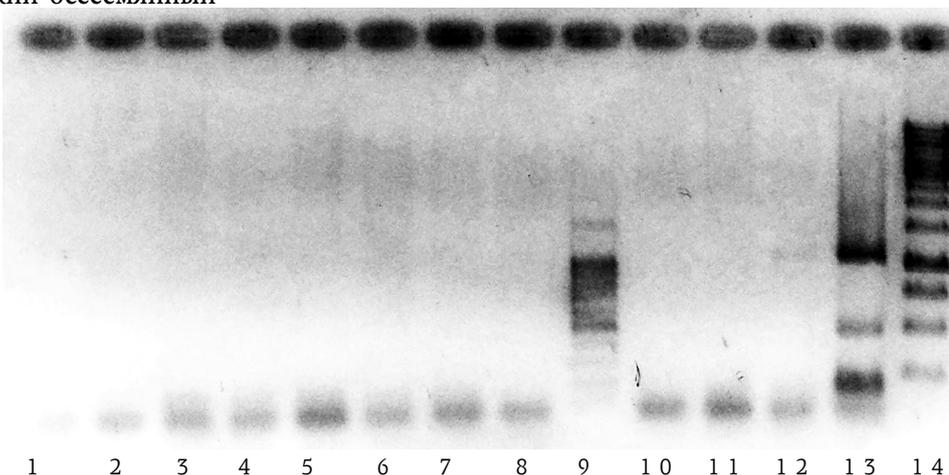


Рис. Тестирование фитопатогенов *Agrobacterium* spp. в растительном материале винограда: 1 – отрицательный контроль; 2–4 – сорт Альминский, термотерапия; 5–6 – сорт Памяти Голодриги, электротерапия; 7 – сорт Цитронный Магарача, термотерапия; 8 – сорт Аврора Магарача, термотерапия; 9 – маркер молекулярного веса (100 п.н.); 10 – сорт Ркацителы Магарача, термотерапия; 11 – сорт Южнобережный, термотерапия; 12 – сорт Антей магарачский, термотерапия; 13 – положительный контроль (*A. tumefaciens*, *A. vitis*, *A. rhizogenes*); 14 – маркер молекулярного веса (1000 п.н.)

Fig. Testing for *Agrobacterium* spp. pathogens in grape plant material: 1 – negative control; 2–4 – ‘Alminski’ variety, thermotherapy; 5–6 – ‘Pamyati Golodrigi’ variety, electrotherapy; 7 – ‘Tsitronnyi Magaracha’ variety, thermotherapy; 8 – ‘Aurora Magaracha’ variety, thermotherapy; 9 – molecular weight marker (100 bp); 10 – ‘Rkatsiteli Magaracha’ variety, thermotherapy; 11 – ‘Yuzhnoberezhnyi’ variety, thermotherapy; 12 – ‘Antei Magarachskiy’ variety, thermotherapy; 13 – positive control (*A. tumefaciens*, *A. vitis*, *A. rhizogenes*); 14 – molecular weight marker (1000 bp)

Таблица 2. Результаты термотерапии и электротерапии для оздоровления растительного материала винограда от возбудителей бактериального рака

Table 2. The results of thermotherapy and electrotherapy in recovering grape plant material from *Agrobacterium* spp. infection

Сорт винограда	Биовары бактериального рака <i>Agrobacterium</i> spp.	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Аврора Магарача	–	–
Альминский	–	–
Памяти Голодриги	<	–
Ркацители Магарача	–	–
Цитронный Магарача	+	–

Примечания: «+» – наличие фитопатогена, «–» – отсутствие фитопатогена, «<» – снижение уровня инфекции

После проведения биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от инфекций в 2023 г. образцы проанализированы на наличие латентной формы фитопатогенов бактериальной этиологии. Молекулярная диагностика образцов на наличие бактериального рака выполнена со специфическими праймерами к биоварам *A. tumefaciens*, *A. vitis* и *A. rhizogenes* (рис.).

Регенерацию после процедур оздоровления в степени, достаточной для проведения тестирования, прошли образцы 5 сортов винограда (табл. 2). Результаты испытаний показали, что после термотерапии полностью элиминирована инфекция *A. tumefaciens* в образцах сортов Аврора Магарача и Ркацители Магарача и *A. rhizogenes* в образцах сортов Альминский и Цитронный Магарача. Ранее сообщалось, что сочетание термотерапии и методов культивирования меристем успешно применяли для оздоровления клонов сортов и подвоев винограда от биовара *A. vitis* и ряда вирусов [21]. Элиминация биовара *A. vitis* из инфицированных растений сорта винограда Рислинг была также достигнута путем культивирования апикальных и аксиллярных почек и меристем из верхушек побегов с последующим микроразмножением в культуре тканей, у оздоровленных растений бактерии не обнаружены даже после многократного и широко тестирования [17]. Поэтому использование биотехнологических методов является перспективным подходом для элиминации инфекции различных биоваров бактериального рака.

После электротерапии на тестирование переданы образцы сорта Памяти Голодриги, результаты показали снижение уровня инфекции *A. tumefaciens*. Электротерапия является относительно быстрой и простой процедурой, может быть полезной стратегией оздоровления растений винограда от инфекционных болезней, но до сих пор не существует публикаций по использованию электротерапии против бактериального рака [19]. Этот относительно новый метод пока

используется только для элиминации вирусов [15].

Растительный материал сорта Цитронный Магарача пока не удалось избавить от инфекции *A. tumefaciens*.

Выводы

При первичном тестировании 18 сортов винограда по результатам ПЦР в образцах 10 сортов выявлен биовар *A. tumefaciens*, в образцах 5 сортов – биовар *A. rhizogenes*, при этом образцы 3 сортов инфицированы двумя биоварами. Проведенные эксперименты показали, что использование биотехнологических методов позволяет элиминировать инфекцию или в значительной степени снизить ее уровень в отношении возбудителей бактериального рака. После термотерапии полностью элиминирована инфекция *A. tumefaciens* в образцах 2 сортов (Аврора Магарача и Ркацители Магарача) и *A. rhizogenes* в образцах 2 сортов (Альминский и Цитронный Магарача). Установлено снижение уровня инфекции *A. tumefaciens* после электротерапии в образцах сорта Памяти Голодриги. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований.

Результаты выполнения работы могут быть использованы для оздоровления растений в научных экспериментах и в производстве посадочного материала винограда для создания насаждений высоких биологических категорий качества.

В дальнейшем предполагается разработать оптимальную схему оздоровления посадочного материала винограда от основных инфекций.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках государственного задания № FNZM-2022-0011 (поисковое исследование).

Financing source

This work was conducted under public assignment No. FNZM-2022-0011 (exploratory research).

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы

1. Алейникова Н.В., Галкина Е.С., Радионовская Я.Э. Болезни и вредители виноградной лозы. Ялта. 2018:1-152.
2. Wang M.R., Bi W.L., Bi W., Bettoni J.C., Zhang D., Volk G.M., Wang Q.C. Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. *Plant Pathology*. 2022;71(6):1241-1254. DOI 10.1111/ppa.13565.
3. Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B., Setubal J.C., Farrand S.K., Nester E.W., Burr T.J., Banta L., Dickerman A.W., Paulsen I., Otten L., Suen G., Welch R., Almeida N.F., Arnold F., Burton O.T., Du Z., Ewing A., Godsy E., Heisel S., Houmiel K.L., Jhaveri J., Lu J., Miller N.M., Norton S., Chen Q., Phoolcharoen W., Ohlin V., Ondrusek D., Pride N., Stricklin S.L., Sun J., Wheeler C., Wilson L., Zhu H., Wood D.W. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(8):2501-2511. DOI 10.1128/JB.01779-08.
4. Deák T., Kupi T., Szegedi E., Bisztray G.D., Oláh R. Identifying plant genes involved in *Agrobacterium* infection of grapevine. *Acta Horticulturae*. 2017;1157:315-320. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1157.44.

5. Bisztray G.D., Civerolo E.L., Dula T., Kölber M., Lázár J., Mugnai L., Szegedi E., Savka M.A. Grapevine pathogens spreading with propagating plant stock: Detection and methods for elimination. *Grapevines: Varieties, Cultivation and Management*. P.V. Szabó, J. Shojania eds. New York: Nova Science Publishers, Hauppauge. 2011:1-86.
6. Арестова Н.О., Рябчун И.О. Распространенность бактериальных болезней винограда в агроценозе Ростовской области // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020;64(4):293-311. DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-293-311.
7. Володин В.А., Рисованная В.И., Гориславец С.М., Волков Я.А., Странишевская Е.П., Шадур Н.И. Определение возбудителей бактериального рака *Agrobacterium* в почве в зимний период // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной наук. 2018:119-120.
8. Поротикова Е.В., Виноградова С.В., Дмитренко Ю.Д., Волков Я.А., Рисованная В.И., Гориславец С.М., Володин В.А., Странишевская Е.П., Камюнская А.М. Молекулярная диагностика бактериальных и вирусных фитопатогенов винограда, актуальных для сельского хозяйства Крыма // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2015;3:19.
9. Странишевская Е.П., Гориславец С.М., Матвейкина Е.А., Шадур Н.И., Волков Я.А. Исследование растительного и почвенного материала на наличие основных болезней бактериальной этиологии, рекомендации по восстановлению и эксплуатации насаждений // Современные научные исследования и разработки. 2018;2(11):679-682.
10. Johnson K.L., Cronin H., Reid C.L., Burr T.J. Distribution of *Agrobacterium vitis* in grapevines and its relevance to pathogen elimination. *Plant Disease*. 2016;100(4):791-796. DOI 10.1094/PDIS-08-15-0931-RE.
11. Батукаев А.А., Собралиева Э.А., Батукаев М.С. Оптимизация основных элементов размножения винограда биотехнологическим методом. Грозный: ИП Магомедалиева С.А. 2019:1-152. DOI 10.36684/18-2019-1-152.
12. Golino D.A., Fuchs M., Sim S., Farrar K., Martelli G.P. Improvement of grapevine planting stock through sanitary selection and pathogen elimination. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. 2017:561-579. DOI 10.1007/978-3-319-57706-7_27.
13. Naik Sh., Banerjee K., Dhekney S.A. Quality planting material of grapes: need to develop plant certification standards for the Indian grape and wine industry. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 2023;12(1):15-26.
14. Zhao L., Wang M., Li J., Cui Z., Volk G.M., Wang Q. Cryobiotechnology: A double-edged sword for obligate plant pathogens. *Plant Disease*. 2019;103(6):1058-1067. DOI 10.1094/PDIS-11-18-1989-FE.
15. Guță I.-C., Buciumeanu E.-C., Tătaru L.D., Oprescu B., Topală C.M. New approach of electrotherapy for grapevine virus elimination. *Acta Horticulturae*. 2019;1242:697-702. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1242.103.
16. Smith G.R., Fletcher J.D., Marroni V., Kean J.M., Stringer L.D., Vereijssen J. Plant pathogen eradication: Determinants of successful programs. *Australasian Plant Pathology*. 2017;46(3):277-284. DOI 10.1007/s13313-017-0489-9.
17. Yepes L., Burr T., Reid C., Fuchs M. Elimination of the crown gall pathogen, *Agrobacterium vitis*, from systemically infected grapevines by tissue culture. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2019;70(3):243-248. DOI 10.5344/ajev.2019.18083.
18. Голодрига П.Я., Зленко В.А., Чекмарев Л.А., Бутенко Р.Г., Левенко Б.А., Пивень Н.М. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда. Ялта: ВНИИ ВиПП Магарач. 1986:1-56.
19. Клименко В.П. Биотехнологические стратегии оздоровления растений винограда от инфекционных болезней. Симферополь: ООО «Типография Мандарин». 2024:1-72.
20. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology*. 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/bf00020088.
21. Ergönül O., Öztürk L. Purification of some grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) and rootstock clones eliminated from viruses with thermotherapy and meristem culture. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2016;16(2):57-61.

References

- Aleynikova N.V., Galkina E.S., Radionovskaya Ya.E. Diseases and pests of grape vine. Yalta. 2018:1-152 (in Russian).
- Wang M.R., Bi W.L., Bi W., Bettoni J.C., Zhang D., Volk G.M., Wang Q.C. Shoot tip cryotherapy for plant pathogen eradication. *Plant Pathology*. 2022;71(6):1241-1254. DOI 10.1111/ppa.13565.
- Slater S.C., Goldman B.S., Goodner B., Setubal J.C., Farrand S.K., Nester E.W., Burr T.J., Banta L., Dickerman A.W., Paulsen I., Otten L., Suen G., Welch R., Almeida N.F., Arnold F., Burton O.T., Du Z., Ewing A., Godsy E., Heisel S., Houmiel K.L., Jhaveri J., Lu J., Miller N.M., Norton S., Chen Q., Phoolcharoen W., Ohlin V., Ondrusek D., Pride N., Stricklin S.L., Sun J., Wheeler C., Wilson L., Zhu H., Wood D.W. Genome sequences of three *Agrobacterium* biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(8):2501-2511. DOI 10.1128/JB.01779-08.
- Deák T., Kupi T., Szegedi E., Bisztray G.D., Oláh R. Identifying plant genes involved in *Agrobacterium* infection of grapevine. *Acta Horticulturae*. 2017;1157:315-320. DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1157.44.
- Bisztray G.D., Civerolo E.L., Dula T., Kölber M., Lázár J., Mugnai L., Szegedi E., Savka M.A. Grapevine pathogens spreading with propagating plant stock: Detection and methods for elimination. *Grapevines: Varieties, Cultivation and Management*. P.V. Szabó, J. Shojania eds. New York: Nova Science Publishers, Hauppauge. 2011:1-86.
- Arestova N.O., Ryabchun I.O. Spreading of bacterial grape diseases in the agrocenosis of Rostov region. *Fruit Growing and Viticulture of South Russia*. 2020;64(4):293-311. DOI 10.30679/2219-5335-2020-4-64-293-311 (in Russian).
- Volodin V.A., Risovannaya V.I., Gorislavets S.M., Volkov Ya.A., Stranishevskaya E.P., Shadura N.I. Determination of pathogens of bacterial cancer *Agrobacterium* in the soil in winter. The Current State, Problems and Prospects for the Development of Agricultural Sciences. 2018:119-120 (in Russian).
- Porotikova E.V., Vinogradova S.V., Dmitrenko Yu.D., Volkov Ya.A., Risovannaya V.I., Gorislavets S.M., Volodin V.A., Stranishevskaya E.P., Kamionskaya A.M. Molecular diagnostics of grapevine bacteria and viruses in the Crimea. *Magarach. Viticulture and Winemaking*. 2015;3:19 (in Russian).
- Stranishevskaya E.P., Gorislavets S.M., Matveikina E.A., Shadura N.I., Volkov Ya.A. Study of plant and soil material for the presence of major diseases of bacterial etiology, recommendations for the restoration and operation of plantations. *Modern Scientific Research and Development*. 2018;2(11):679-682 (in Russian).
- Johnson K.L., Cronin H., Reid C.L., Burr T.J. Distribution of *Agrobacterium vitis* in grapevines and its relevance to pathogen elimination. *Plant Disease*. 2016;100(4):791-796. DOI 10.1094/PDIS-08-15-0931-RE.
- Batukaev A.A., Sobralieva E.A., Batukaev M.S. Optimization of the main elements of grape propagation by the

- biotechnological method. *Groznyi: IE Magomedalieva S.A.* 2019;1-152. DOI 10.36684/18-2019-1-152 (in Russian).
12. Golino D.A., Fuchs M., Sim S., Farrar K., Martelli G.P. Improvement of grapevine planting stock through sanitary selection and pathogen elimination. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management.* 2017;561-579. DOI 10.1007/978-3-319-57706-7_27.
 13. Naik Sh., Banerjee K., Dhekney S.A. Quality planting material of grapes: need to develop plant certification standards for the Indian grape and wine industry. *International Journal of Agriculture Innovations and Research.* 2023;12(1):15-26.
 14. Zhao L., Wang M., Li J., Cui Z., Volk G.M., Wang Q. Cryobiotechnology: A double-edged sword for obligate plant pathogens. *Plant Disease.* 2019;103(6):1058-1067. DOI 10.1094/PDIS-11-18-1989-FE.
 15. Guță I.-C., Buciumeanu E.-C., Tătaru L.D., Oprescu B., Topală C.M. New approach of electrotherapy for grapevine virus elimination. *Acta Horticulturae.* 2019;1242:697-702. DOI 10.17660/ActaHortic.2019.1242.103.
 16. Smith G.R., Fletcher J.D., Marroni V., Kean J.M., Stringer L.D., Vereijssen J. Plant pathogen eradication: Determinants of successful programs. *Australasian Plant Pathology.* 2017;46(3):277-284. DOI 10.1007/s13313-017-0489-9.
 17. Yepes L., Burr T., Reid C., Fuchs M. Elimination of the crown gall pathogen, *Agrobacterium vitis*, from systemically infected grapevines by tissue culture. *American Journal of Enology and Viticulture.* 2019;70(3):243-248. DOI 10.5344/ajev.2019.18083.
 18. Golodriga P.Ya., Zlenko V.A., Chekmarev L.A., Butenko R.G., Levenko B.A., Piven N.M. Methodological recommendations on clonal micro-propagation of grapes. Yalta: ASRI G&PP Magarach. 1986:1-56 (in Russian).
 19. Klimenko V.P. Biotechnological strategies for improving the health of grape plants from infectious diseases. *Simferopol: Mandarin Publ.* 2024:1-72 (in Russian).
 20. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Molecular Biology.* 1985;5(2):69-76. DOI 10.1007/bf00020088.
 21. Ergönül O., Öztürk L. Purification of some grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) and rootstock clones eliminated from viruses with thermotherapy and meristem culture. *Trakya University Journal of Natural Sciences.* 2016;16(2):57-61.

Информация об авторах

Виктор Павлович Клименко, д-р с.-х. наук, ст. науч. сотр., гл. науч. сотр., зав. лабораторией генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: vikklim@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7452-0776>;

Екатерина Александровна Лушай, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: ekaterina.lushai@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5695-5936>;

Ирина Александровна Павлова, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: pavlovairina1965@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0818-8215>;

Анифе Смаиловна Абдурашитова, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: abdurashitova97@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2419-6477>;

Валерий Анатольевич Зленко, канд. с.-х. наук, доцент, вед. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: vazlenko@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3363-8292>;

Мария Игоревна Григоренко, мл. науч. сотр. лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда; e-мэйл: mary_kosuyk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8565-0082>;

Геннадий Юрьевич Спотарь, аспирант, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: probud@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

Гурий Викторович Корнильев, канд. биол. наук, вед. инженер лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: guriy-kornilev@yandex.com; <https://orcid.org/0000-0001-6876-3424>;

Яна Юрьевна Рязанкина, инженер лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: yana3532@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4668-376X>.

Information about authors

Victor P. Klimenko, Dr. Agric. Sci., Senior Staff Scientist, Chief Staff Scientist, Head of the Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: vikklim@magarach-institut.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7452-0776>;

Ekaterina A. Lushchay, Junior Staff Scientist; Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: ekaterina.lushai@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5695-5936>;

Irina A. Pavlova, Cand. Agric. Sci., Senior Staff Scientist, Leading Staff Scientist, Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: pavlovairina1965@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0818-8215>;

Anife S. Abdurashitova, Junior Staff Scientist; Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: abdurashitova97@inbox.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2419-6477>;

Valery A. Zlenko, Cand. Agric. Sci., Assistant Professor, Leading Staff Scientist, Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: vazlenko@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3363-8292>;

Maria I. Grigorenko, Junior Staff Scientist; Laboratory of Genetics, Biotechnologies of Grape Breeding and Propagation; e-mail: mary_kosuyk@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8565-0082>;

Gennadiy Yu. Spotar, Postgraduate, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: probud@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6725-250X>;

Hurii V. Korniliev, Cand. Biol. Sci., Lead Engineer, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: guriy-kornilev@yandex.com; <https://orcid.org/0000-0001-6876-3424>;

Yana Yu. Ryazankina, Engineer, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: yana3532@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4668-376X>.

Статья поступила в редакцию 30.05.2024, одобрена после рецензии 12.07.2024, принята к публикации 27.08.2024.