

Биотехнологические решения для оздоровления растительного материала винограда от инфекционных болезней

Клименко В.П., Лушай Е.А.[✉], Павлова И.А., Абдурашитова А.С., Зленко В.А., Григоренко М.И., Спотарь Г.Ю., Спотарь Е.Н., Мироненко А.А., Пахомова Е.П.

Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Ялта, Россия

[✉]biogen@magarach-institut.ru

Аннотация. Для создания свободного от инфекций посадочного материала растений перспективным является использование биотехнологических методов. Целью данного оригинального исследования является получение новых знаний в ходе проведения биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от латентных инфекций для их последующего практического применения. Объект исследования – культивирование растений винограда *in vitro*, инфекционные болезни, оздоровление растительного материала. Проведены биотехнологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от вирусов и бактериального рака, включая термотерапию, химиотерапию, электротерапию и культуру меристем. Осуществлена молекулярная диагностика латентной формы фитопатогенов в растительном материале после процедур оздоровления. После процедур оздоровления достигнуто полное или в значительной степени оздоровление образцов от вируса скручивания листьев серотип 1, вируса коротокоузлия винограда, вируса бороздчатости древесины Рупестрис и возбудителей бактериального рака *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Разработана методологии соматического эмбриогенеза и регенерации растений у винограда сделала возможным получение растений в необходимом и достаточном объеме для проверки пригодности данного метода в отношении оздоровления от GRSPaV. Для сохранения в культуре *in vitro* проводится микроклональное размножение оздоровленных по результатам тестирования образцов экспериментальных сортов. Всего поддерживается в культуре *in vitro* 11 линий, свободных от инфекций. Проведенные биотехнологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от латентных инфекций предоставили возможность получить современные знания, позволяющие оптимизировать элиминацию фитопатогенов в биотехнологических системах. По результатам теоретических и практических исследований разработана схема оздоровления растительного материала винограда от основных инфекций биотехнологическими методами. Предлагаются биотехнологические решения, которые можно использовать для оздоровления растений винограда от широкого спектра латентных инфекций, вызываемых вирусами, фитоплазмами и возбудителями бактериального рака.

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

Для цитирования: Клименко В.П., Лушай Е.А., Павлова И.А., Абдурашитова А.С., Зленко В.А., Григоренко М.И., Спотарь Г.Ю., Спотарь Е.Н., Мироненко А.А., Пахомова Е.П. Биотехнологические решения для оздоровления растительного материала винограда от инфекционных болезней // «Магарач». Виноградарство и виноделие. 2025;27(3):169-176. EDN GCMHGA.

ORIGINAL RESEARCH

Biotechnological solutions for the recovery of grape plant material from infectious diseases

Klimenko V.P., Lushchay E.A.[✉], Pavlova I.A., Abdurashitova A.S., Zlenko V.A., Grigorenko M.I., Spotar G.Yu., Spotar E.N., Mironenko A.A., Pakhomova E.P.

All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" of the National Research Centre "Kurchatov Institute", Yalta, Russia

[✉]biogen@magarach-institut.ru

Abstract. The use of biotechnological methods is promising for the creation of infection-free plant material. The aim of this original research was to obtain new knowledge during biotechnological operations for the recovery of grape plant material from latent infections for subsequent practical use. The research focused on cultivating grape plants *in vitro*, infectious diseases, and recovery of plant material. The complex of technological operations for recovery of grape plant material from viruses and *Agrobacterium* spp. was carried out, including thermotherapy, chemotherapy, electrotherapy and meristem culture. After the recovery procedures, molecular diagnostics were performed on the latent form of phytopathogens in plant material. Complete or significant recovery of samples from GLRaV-1, GFLV, GRSPaV, *A. tumefaciens* and *A. rhizogenes* was achieved after recovery procedures. The development of a methodology for somatic embryogenesis and plant regeneration in grapes has made it possible to obtain plants in the necessary and sufficient quantity to verify the suitability of this method with respect to GRSPaV elimination. The microclonal propagation of recovered samples of experimental varieties is carried out for preservation *in vitro*. A total of 11 infection-free lines are maintained *in vitro*. The biotechnological operations carried out to recover the plant material from latent infections have provided an opportunity to obtain modern knowledge, allowing to optimize the elimination of phytopathogens in biotechnological systems. The scheme for the recovery of grape plant material from the main infections by biotechnological methods is developed on the basis of theoretical and practical studies. Biotechnological solutions that can be used to cure grape plants from a wide range of latent infections caused by viruses, phytoplasmas and *Agrobacterium* spp. are offered.

Key words: phytopathogens; elimination; testing; *in vitro*; thermotherapy; chemotherapy; electrotherapy; meristem culture.

Для цитирования: Klimenko V.P., Lushchay E.A., Pavlova I.A., Abdurashitova A.S., Zlenko V.A., Grigorenko M.I., Spotar G.Yu., Spotar E.N., Mironenko A.A., Pakhomova E.P. Biotechnological solutions for the recovery of grape plant material from infectious diseases. Magarach. Viticulture and Winemaking. 2025;27(3):169-176. EDN GCMHGA (in Russian).

Введение

Виноград склонен к заражению множеством инфекционных заболеваний, которые причиняют существенный урон виноградным насаждениям [1–5]. Фитопатогены перепрограммируют метаболизм растений, нарушая ключевые пути, критически важные для роста и защиты, и представляют опасность для мирового сельского хозяйства, приводя к значительным потерям урожая, что ставит под угрозу продовольственную безопасность и нарушает стабильность экосистем [6–8]. Методы размножения значительно влияют на генетическое разнообразие и устойчивость к болезням винограда [9]. Свободный от инфекций посадочный материал обеспечивает стабильное развитие виноградарства и виноделия [10–13]. Результаты применения биотехнологических методов предлагают ценную информацию о стратегиях, используемых для противодействия фитопатогенам, которые угрожают производству многолетних культур [14]. С разной степенью успеха для устранения фитопатогенов в многолетних растениях используются методы *in vitro*, включая культивирование апексов, микропрививку, термотерапию, химиотерапию и криотерапию верхушек побегов [15–19]. Более высокая эффективность элиминации патогенов может быть достигнута путем объединения двух или более из этих методов.

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

Материалы и методы исследования

Исследования проводили в 2022–2024 гг. в лаборатории генетики, биотехнологий селекции и размножения винограда и лаборатории молекулярно-генетических исследований института «Магарач», г. Ялта. В качестве материала для экспериментов использовали растения *in vitro* межвидовых сортов винограда. Получение, культивирование и клональное микроразмножение растений, а также исследования по соматическому эмбриогенезу и регенерации растений из клеток суспензионных культур осуществляли согласно рекомендациям, опубликованным в печати [20, 21].

В работе использовали следующие среды: MS – базовая 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).

На ампелографической коллекции и селекционных участках института «Магарач» заготавливали с кустов однолетнюю виноградную лозу для использования в качестве экспериментального исходного материала. Черенки проращивали при 20–22 °С и влажности 60–65 %. Образовавшиеся зеленые побеги отсекали, удаляли листья, разрезали на одно-двухглазковые экспланты и помещали в биксы. Опе-

рации по стерилизации опытного материала и посадкам на питательные среды проводили в ламинарном боксе. Стерилизацию осуществляли 96 %-ным спиртом-ректификатом в течение 40 с и диоксидом в течение 8 мин. с последующей трехкратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой в течение 15 мин. Затем экспланты высаживали на модифицированную среду MS, дополненную 6-бензиламинопурином в концентрации 0,4 мг/л. Образовавшиеся побеги для укоренения пересаживали на среду PG, содержащую α-нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,05 мг/л. Культивирование осуществляли при 16-ти часовом фотопериоде с освещенностью 1500 люкс и температуре 27 °С. Экспланты сортов винограда, введенные в культуру в 2022–2023 гг., размножали до необходимого количества и использовали в дальнейших работах по оздоровлению. Всего в 2022–2024 гг. для выполнения работ в культуре поддерживалось около 2000 шт. растений *in vitro*.

Методы оздоровления растений винограда *in vitro* использовали согласно рекомендациям, опубликованным в печати [22].

По схеме оздоровления с помощью термотерапии применяли климатическую камеру Binder KBWF 240, время культивирования растений в камере составляло 624 часа.

По схеме оздоровления с помощью химиотерапии растения *in vitro* высаживали на среду PG, дополненную НУК в концентрации 0,05 мг/л и с добавлением после автоклавирования препарата рибавирин в концентрации 60 мг/л.

По схеме оздоровления с помощью электротерапии применяли камеру горизонтального электрофореза Minie-135. В процессе электротерапии исследовали до пяти вариантов воздействия электрическим током: 0 (контроль), 30 мА, 40 мА, 50 мА и 100 мА на протяжении 10–20 мин. Для электротерапии использовали фрагменты зеленых побегов винограда. После процедуры экспланты вводили в условия *in vitro*.

По схеме оздоровления с помощью культуры меристем отработывали методику с микроскопом Levenhuk Rainbow DM500 и микроскопом Crystallite ST-7045 для проведения биотехнологических операций с использованием меристемного метода.

После процедур оздоровления растительный материал дублировали, проводили клональное микроразмножение и повторное тестирование образцов на наличие фитопатогенов. При этом тестировали каждую по отдельности линию растений *in vitro*, полученную при микроразмножении образцов.

Экстракцию РНК (вирусные патогены) или ДНК (бактериальные патогены) выполняли с использованием экстрагирующего буфера ЦТАБ [23]. Для тестирования патогенов вирусной этиологии использовали метод ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), РНК → кДНК → ПЦР. Наличие патогенов бактериальной этиологии исследовали методом биоПЦР, который включал в себя два основных

этапа: микробиологический, для получения накопительных культур при тестировании *Agrobacterium* spp. и молекулярный – ПЦР. На заключительном этапе исследования для детекции результатов по бактериальному раку и вирусам использовали метод геля – 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» и стандарту организации 01586301.029-2020 «Виноград, плодовые, орехоплодные, ягодные, декоративные культуры. Определение вирусных и виroidных фитопатогенов методом ОТ-ПЦР».

Для работ по тестированию фитопатогенов использовали следующие приборы: амплификатор T-100 BioRad с последующим разделением продуктов амплификации на приборе для геля-электрофореза BioRad, центрифуга с охлаждением Eppendorf 5417 R, амплификатор для ПЦР в реальном времени АНК-32, спектрофотометр Biophotometer plus, твердотельный термостат, мини-центрифуги Вортекс, бокс микробиологической безопасности Lamsystems и трансиллюминатор ЕСХ-F20М, ПЦР бокс Lamsystems.

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

Результаты и их обсуждение

Биотехнологические операции по оздоровлению растительного материала винограда от латентных инфекций осуществляли по нескольким схемам.

По схеме оздоровления с помощью термотерапии в ряде образцов достигнуто снижение уровня инфекции вируса короткоузлия винограда (GFLV) до 0–11 %, при этом элиминацию фитопатогена наблюдали в 63 % повторностей. Также снижен уровень инфекции вируса борозчатости древесины Рупестрис (GRSPaV) до 7 %, элиминацию фитопатогена наблюдали в 31 % повторностей. Снижен уровень инфекции биовара бактериального рака *A. tumefaciens* до 0–5 %, элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях. Снижен уровень инфекции биовара бактериального рака *A. rhizogenes* до 0–3 %, элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях. Термотерапия растений *in vitro* известна как распространенный метод элиминации фитопатогенов [24].

По схеме оздоровления с помощью культуры меристем в ряде образцов достигнуто снижение уровня инфекции вируса скручивания листьев винограда, серотип 1 (GLRaV-1) до 0, при этом элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях. Скручивание листьев винограда является одним из наиболее вредоносных заболеваний виноградной лозы, которое наносит большой экономический ущерб; к сожалению, пока еще недостаточным явля-

ется понимание молекулярных механизмов, управляющих репликацией генома вируса скручивания листьев, экспрессией генов и взаимодействием вируса с хозяином [25, 26]. Снижен также уровень инфекции GRSPaV до 0, элиминацию фитопатогена наблюдали в 40 % повторностей; снижен уровень инфекции биовара *A. tumefaciens* до 0–9 %, элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях. Снижен уровень инфекции биовара *A. rhizogenes* до 0, элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях. Проведен анализ различных вариантов сред с комбинациями питательных веществ для поиска эффективной процедуры оздоровления с помощью апикальной меристемы.

По схеме оздоровления с помощью химиотерапии в ряде образцов достигнуто снижение уровня инфекции GRSPaV до 0–31 %, при этом элиминацию фитопатогена наблюдали в 75 % повторностей. В порядке продолжения оздоровительных мероприятий проводили химиотерапию образцов 5 сортов винограда. По 15 эксплантов побегов каждого из сортов Антей магарачский, Красень, Памяти Голодриги, Рислинг Магарача и Спартанец Магарача высажены на среду РГ, дополненную НУК (0,05 мг/л), с добавлением после автоклавирования препарата рибавирин в концентрации 60 мг/л. Через 40 дней провели оценку показателей роста растений. По всем образцам отмечали общее угнетение растений и замедление ростовых процессов. У образцов сортов Спартанец Магарача, Рислинг Магарача наблюдали усыхание эксплантов побегов и образование осенней окраски листовой пластинки. При этом выявлена сортовая специфичность развития морфологических структур под влиянием рибавирина. Образование единичных побегов зафиксировано у образцов сорта Памяти Голодриги. У образцов сорта Красень отмечено образование корешков и развитие побегов. Средняя длина побега составила 0,7 см, характерно формирование сближенных междоузлий и укороченных корешков размером 0,2–0,3 мм. В дальнейшем предполагается пересадка верхушек растений каждого образца на среду РГ без антибиотика, дублирование и передача материала на повторное тестирование. Химиотерапия считается успешным методом оздоровления растений винограда *in vitro*, особенно в сочетании с другими методами [27, 28].

По схеме оздоровления с помощью электротерапии в ряде образцов достигнуто снижение уровня инфекции биовара *A. tumefaciens* до 0, при этом элиминацию фитопатогена наблюдали по всем повторностям. В порядке продолжения оздоровительных мероприятий проводили электротерапию эксплантов сорта Артек. После воздействия электрическим током экспланты вводили в условия *in vitro*. Через 1 месяц провели учет количества растений, прошедших регенерацию. Минимальное количество растений оказалось в вариантах 30 и 50 мА (по одному растению), 50 % в варианте 40 мА, 55,5 % при воздействии 100 мА, в контроле 62,5 %. Растения пере-

садили на среду для размножения, в дальнейшем предстоит повторная молекулярная диагностика. Электротерапия растительного материала является методом редко используемым, но заслуживающим внимания [29].

В отношении оздоровления растительного материала от вирусных инфекций наибольшего внимания заслуживает элиминация GLRaV-1 в образцах Альминский № М.2.19.04, полная или в значительной степени элиминация GFLV в образцах Подарок Магарача № Т2.31.08/27.04 и Южнобережный № Т2 10.10/12.03, полная или в значительной степени элиминация GRSPaV в образцах Альминский № М.2.19.04, Антей магарачский № Т3.29.11, Гранатовый Магарача № Х.02.11 и Памяти Голодриги Т (табл. 1).

В отношении оздоровления растительного материала винограда от бактериальных инфекций особого внимания заслуживает элиминация биовара *A. rhizogenes* в образцах Альминский № М.2.19.04 и Сафьяновый № Т2.31.08, полная или в значительной степени элиминация биовара *A. tumefaciens* в образцах Памяти Голодриги Т, Памяти Голодриги № М1.1.7.03/6.06, Памяти Голодриги № М1.3.7.03/6.06, Подарок Ма-

гарача № Т2.6.08/27.04 и Подарок Магарача № Т2.31.08/27.04 (табл. 2).

При выборе биотехнологической стратегии для уничтожения инфекций должны быть учтены особенности фитопатогена, который необходимо элиминировать, генотип растения-хозяина, физиологическое состояние растений, а также способность к регенерации [22]. Тем не менее, полученные результаты демонстрируют особые успехи в оздоровлении от фитопатогенов, достигнутые на материале сортов винограда Альминский, Памяти Голодриги и Подарок Магарача.

Опубликованные ранее результаты исследований показали, что наиболее многообещающей процедурой для элиминации GRSPaV является соматический эмбриогенез [30]. Прозембриогенные каллусы, полученные с инфицированных GRSPaV растений сортов Аврора Магарача, Гранатовый Магарача, Красень и Памяти Голодриги, субкультивировали на питательные среды для развития глобулярных эмбрионидов. Всего в опытах использовали 94 варианта жидких и твердых питательных сред с различными комбинациями биологически активных веществ. В культуре *in vitro* получили растения-соматоклоны сорта Аврора Магарача. Разработка методологии со-

Таблица 1. Результаты комплекса биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от вирусных инфекций, включающего термотерапию, химиотерапию, электротерапию и культуру меристем

Table 1. The results of a complex of biotechnological operations for the recovery of grape plant material from viral infections, including thermotherapy, chemotherapy, electrotherapy and meristem culture

Образец, линия	Наличие вирусной инфекции в образцах, %					
	до процедур оздоровления			после процедур оздоровления		
	GLRaV-1	GFLV	GRSPaV	GLRaV-1	GFLV	GRSPaV
Альминский № М.2.19.04	100,0±7,4 ^a	0	100,0±6,5 ^a	0	0	0
Антей магарачский № Т1.8.09	0	50,0±3,1 ^b	33,3±7,4 ^c	0	55,3±3,4 ^b	30,7±2,9 ^c
Антей магарачский № Т3.29.11	0	0	100,0±8,4 ^a	0	0	9,9±1,2 ^c
Антей магарачский № Т3.1.12	0	50,0±4,9 ^b	100,0±6,7 ^a	0	51,0±6,1 ^b	54,7±6,2 ^b
Антей магарачский № Х.20.10.2.11.1.04	0	0	100,0±8,1 ^a	0	0	30,7±3,3 ^c
Гранатовый Магарача № Т3.1.24.11	0	25,0±3,4 ^c	100,0±6,7 ^a	0	25,0±2,7 ^c	89,5±7,9 ^a
Гранатовый Магарача № Т3.2.29.11	0	25,0±2,6 ^c	100,0±5,4 ^a	0	24,0±2,8 ^c	91,5±5,5 ^a
Гранатовый Магарача № Х.02.11	0	100,0±9,0 ^a	100,0±6,5 ^a	0	89,0±7,3 ^a	0
Памяти Голодриги Т	0	100,0±7,7 ^a	100,0±7,8 ^a	0	87,0±6,8 ^a	7,0±1,3 ^c
Памяти Голодриги № М1.1.7.03/6.06	0	100,0±6,5 ^a	100,0±8,8 ^a	0	78,0±6,9 ^d	84,0±6,8 ^a
Памяти Голодриги № М1.2.7.03/6.06	0	0	100,0±7,2 ^a	0	0	67,0±5,6 ^d
Памяти Голодриги № М1.3.7.03/6.06	0	0	100,0±5,6 ^a	0	0	88,0±6,4 ^a
Памяти Голодриги № ЭК.10.10/24.04	50,0±4,9 ^b	20,0±2,3 ^c	100,0±9,0 ^a	42,5±5,3 ^b	21,5±3,6 ^c	73,5±5,5 ^d
Памяти Голодриги № Э30.10.10/24.04	50,0±4,7 ^b	20,0±2,2 ^c	100,0±8,9 ^a	0	0	69,0±4,9 ^d
Подарок Магарача № Т2.6.08/27.04	0	100,0±7,8 ^a	100,0±8,5 ^a	0	69,5±6,8 ^d	89,0±8,0 ^a
Подарок Магарача № Т2.31.08/27.04	0	100,0±3,9 ^a	100,0±4,2 ^a	0	0	55,0±4,7 ^b
Сафьяновый № Т2.31.08	0	0	0	0	0	0
Южнобережный № Т2 10.10/12.03	0	100,0±5,8 ^a	0	0	11,0±1,5 ^c	0
Южнобережный № Т3 29.11/12.03	0	100,0±6,8 ^a	0	0	65,0±5,3 ^d	0
Южнобережный № Т3.30.11/29.03	0	100,0±9,4 ^a	0	0	74,5±6,2 ^d	0
Южнобережный № Х.2.11	0	100,0±4,7 ^a	0	0	30,3±4,5 ^c	0

Примечание. Значения с различными буквами имеют статистически значимые различия при $p \leq 0,05$

Таблица 2. Результаты комплекса биотехнологических операций по оздоровлению растительного материала винограда от бактериальных инфекций, включающего термотерапию, химиотерапию, электротерапию и культуру меристем

Table 2. The results of a complex of biotechnological operations for the recovery of grape plant material from bacterial infections, including thermotherapy, chemotherapy, electrotherapy and meristem culture

Образец, линия	Наличие бактериальной инфекции в образцах, %			
	до процедур оздоровления		после процедур оздоровления	
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
Альминский № М.2.19.04	10,0±1,4 ^a	100,0±3,4 ^c	9,5±1,4 ^a	0
Антей магарачский № Т1.8.09	5,0±1,0 ^b	66,7±5,8 ^d	3,7±1,1 ^b	57,3±7,2 ^d
Антей магарачский № Т3.29.11	5,0±0,6 ^a	50,0±5,6 ^d	6,0±1,1 ^b	37,5±4,2 ^c
Антей магарачский № Т3.1.12	0	20,0±1,8 ^a	0	15,7±1,9 ^a
Антей магарачский № Х.20.10.2.11.1.04	10,0±1,3 ^a	20,0±2,5 ^a	11,7±1,7 ^a	16,7±2,3 ^a
Гранатовый Магарача № Т3.1.24.11	0	0	0	0
Гранатовый Магарача № Т3.2.29.11	5,0±0,8 ^b	66,7±8,6 ^d	6,5±1,0 ^b	64,2±4,9 ^d
Гранатовый Магарача № Х.02.11	5,0±0,4 ^b	0	5,0±0,4 ^b	0
Памяти Голодриги Т	100,0±8,8 ^c	0	5,0±0,9 ^b	0
Памяти Голодриги № М.1.1.7.03/6.06	100,0±5,4 ^c	0	0	0
Памяти Голодриги № М.1.2.7.03/6.06	100,0±7,8 ^c	5,0±0,6 ^b	36,0±4,8 ^c	4,5±0,7 ^b
Памяти Голодриги № М.1.3.7.03/6.06	100,0±9,8 ^c	0	0	0
Памяти Голодриги № ЭК.10.10/24.04	100,0±3,8 ^c	0	0	0
Памяти Голодриги № Э30.10.10/24.04	100,0±6,4 ^c	0	0	0
Подарок Магарача № Т2.6.08/27.04	100,0±5,5 ^c	100,0±5,2 ^c	0	49,8±3,7 ^d
Подарок Магарача № Т2.31.08/27.04	100,0±8,1 ^c	100,0±9,1 ^c	0	3,3±0,9 ^b
Сафьяновый № Т2.31.08	0	100,0±6,3 ^c	0	0
Южнобережный № Т2 10.10/12.03	20,0±2,6 ^a	0	15,5±1,7 ^a	0
Южнобережный № Т3 29.11/12.03	20,0±1,7 ^a	0	19,0±1,8 ^a	0
Южнобережный № Т3 30.11/29.03	0	0	0	0
Южнобережный № Х.2.11	0	66,7±7,4 ^d	0	52±6,4 ^d

Примечание. Значения с различными буквами имеют статистически значимые различия при $p \leq 0,05$

матического эмбриогенеза и регенерации растений делает возможным получение материала для проверки пригодности данного метода в отношении оздоровления от GRSPaV.

Для сохранения в культуре *in vitro* проводили микроклональное размножение оздоровленных по результатам тестирования образцов экспериментальных сортов. Растения, свободные от фитопатогенов, необходимы в качестве материала для размножения зародышевой плазмы, а также для глобального обмена генетическими ресурсами виноградной лозы [31]. В частности, приступили к клональному микроразмножению образца, свободного от инфекций, сорта Гранатовый Магарача для получения оздоровленной линии растений. На среду РГ, содержащую НУК в концентрации 0,05 мг/л, высадили 20 эксплантов побегов данного образца, приживаемость составила 100 %. Полученные растения размножены. Высадили на аналогичную среду 122 экспланта побегов данного сорта. Всего поддерживается в культуре *in vitro* 11 линий, свободных от

инфекций. Линиями межвидовых сортов селекции института «Магарач», свободными от латентных инфекций, предполагается пополнить вегетирующую коллекцию винограда *in vitro*.

По результатам теоретических и практических исследований разработана схема оздоровления растительного материала винограда от основных инфекций биотехнологическими методами (рис.). В схеме учитывается использование различных методов оздоровления и особенности элиминации различных фитопатогенов. Оформлен РИД технологическое научное произведение № 239 от 22.11.2024 г. «Технология оздоровления растительного материала винограда биотехнологическими методами». Технология предназначена для элиминации латентных инфекций, вызываемых вирусами, фитоплазмами и возбудителями бактериального рака, в растениях *in vitro*. Предлагаются биотехнологические решения, которые можно использовать для оздоровления растений винограда от широкого спектра латентных инфекций.



Рис. Схема оздоровления растительного материала винограда от основных инфекций биотехнологическими методами

Fig. Scheme of recovery of plant material of grapes from the main infections by biotechnological methods

Выводы

Проведенные операции по оздоровлению растительного материала винограда от латентных инфекций предоставили возможность получить знания, позволяющие оптимизировать элиминацию фитопатогенов в биотехнологических системах.

Разработанная на основе полученных знаний схема оздоровления растительного материала винограда биотехнологическими методами предусматривает набор операций с указанием последовательности их выполнения по всем этапам оздоровления образцов.

После проведения термотерапии в ряде образцов снижен уровень инфекции GFLV до 0, GRSPaV – до 7 %, *A. tumefaciens* – до 0, *A. rhizogenes* – до 0.

В ходе использования культуры меристем в ряде образцов снижен уровень инфекции GLRaV-1, GRSPaV, *A. tumefaciens* и *A. rhizogenes* – до 0.

В результате химиотерапии в ряде образцов снижен уровень инфекции GRSPaV до 0, применение для оздоровления растительного материала винограда от вирусной инфекции метода химиотерапии позволило установить сортовую специфичность развития морфологических структур под влиянием рибавирина.

Вследствие электротерапии в ряде образцов снижен уровень инфекции биовара бактериального рака *A. tumefaciens* до 0, элиминацию фитопатогена наблюдали во всех повторностях.

Источник финансирования

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

Financing source

The work was conducted under public assignment No. FNZM-2022-0011 (Exploratory research).

Конфликт интересов

Не заявлен.

Conflict of interests

Not declared.

Список литературы / References

1. Алейникова Н.В., Галкина Е.С., Радионовская Я.Э. Болезни и вредители виноградной лозы. Санкт-Петербург: Первый издательско-полиграфический холдинг. 2018:1-152.
Aleinikova N.V., Galkina E.S., Radionovskaya Ya.E. Diseases and pests of the vine. Saint Petersburg: First Publishing and Printing Holding. 2018:1-152 (in Russian).
2. Странишевская Е.П., Гориславец С.М., Матвейкина Е.А., Шадура 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.
Stranishevskaya E.P., Gorislavets S.M., Matveikina E.A., Shadura N.I., Volkov Ya.A. Investigation 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).
3. 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;100:791-796. DOI 10.1094/PDIS-08-15-0931-RE.
4. Porotikova E., Terehova U., Volodin V., Yurchenko E., Vinogradova S. Distribution and genetic diversity of grapevine viruses in Russia. Plants. 2021;10(6):1080. DOI 10.3390/plants10061080.
5. Shvets D., Sandomirsky K., Porotikova E., Vinogradova S. Metagenomic analysis of ampelographic collections of Dagestan revealed the presence of two novel grapevine viruses. Viruses. 2022;14(12):2623. DOI 10.3390/v14122623.
6. Jiang T., Hao T., Chen W., Li C., Pang S., Fu C., Cheng J., Zhang C., Ghorbanpour M., Miao S. Reprogrammed plant metabolism during viral infections: mechanisms, pathways and implications. Molecular Plant Pathology. 2025;26(2):70066. DOI 10.1111/mpp.70066.
7. Marais A., Gentit P., Brans Y., Renvoisé J.P., Faure C., Saison A., Cousseau P., Castaing J., Chambon F., Pion A., Calado G., Lefebvre M., Garnier S., Latour F., Bresson K., Grasseau N., Candresse T. Comparative performance evaluation of double-stranded RNA high-throughput sequencing for the detection of viral infection in temperate fruit crops. Phytopathology. 2024;114(7):1701-1709. DOI 10.1094/PHYTO-12-23-0480-R.
8. Tatineni S., Hein G.L. Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virus disease management strategies. Phytopathology. 2023;113(2):117-141. DOI 10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW.
9. Батукаев А.А., Собралиева Э.А., Батукаев М.С. Оптимизация основных элементов размножения винограда биотехнологическим методом. Грозный: Чеченский государственный университет им. А.А. Кадырова. 2019:1-152. DOI 10.36684/18-2019-1-152.
Batukaev A.A., Sobralieva E.A., Batukaev M.S. Optimization of the main elements of grape propagation by the biotechnological method. Grozny: Chechen State University named after A.A. Kadyrov. 2019:1-152. DOI 10.36684/18-2019-1-152 (in Russian).
10. 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.
11. Naik Sh., Banerjee K., Dhekney S.A. Quality planting material of grape: 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.
12. Thagunna S. S. A review on propagation methods of grape (*Vitis vinifera* L.). Reviews in Food and Agriculture. 2023;4(1):28-31. DOI 10.26480/rfna.01.2023.28.31.
13. Карпушина М.В., Супрун И.И. Методы и подходы к элиминации вирусов в условиях *in vitro* и *in vivo* // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2020;63(3):254-269. DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269.
Karpushina M., Suprun I. Methods and approaches to virus elimination under *in vitro* and *in vivo* conditions. Fruit Growing and Viticulture of South Russia. 2020;63(3):254-269. DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269 (in Russian).
14. Thanuja K., Arulmozhiyan R., Saraswathi M.S., Selvarajan R., Jegadeeswari V., Rajanbabu V. A comprehensive review on *in vitro* therapies for virus elimination and novel methods for virus protection in key horticultural crops. Planta. 2025;262(1):15. DOI 10.1007/s00425-025-04718-w.
15. Bettoni J.C., Wang M.R., Li J.W., Fan X., Fazio G., Hurtado-Gonzales O.P., Volk G.M., Wang Q.C. Application of biotechniques for *in vitro* virus and viroid elimination in pome fruit crops. Phytopathology. 2024;114(5):930-954. DOI 10.1094/PHYTO-07-23-0232-KC.
16. 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.
17. Tarquini G., Dall'Ara M., Ermacora P., Ratti C. Traditional approaches and emerging biotechnologies in grapevine virology. Viruses. 2023;15(4):826. DOI 10.3390/v15040826.
18. 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;46:277-284. DOI 10.1007/s13313-017-0489-9.
19. 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.
20. 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: ВНИИВиП. 1986:1-56.
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: VNIIViP. 1986:1-56 (in Russian).
21. Pavlova I., Luschay E., Kosyuk M., Abdurashitova A., Klimenko V. The effect of cultivation conditions on the growing processes of grape plants *in vitro*. BIO Web of Conferences. 2021;39:03001. DOI 10.1051/bioconf/20213903001.
22. Клименко В.П. Биотехнологические стратегии оздоровления растений винограда от инфекционных болезней. Симферополь: ООО «Типография Мандарин». 2024:1-72.
Klimenko V.P. Biotechnological strategies for improving the health of grape plants from infectious diseases. Simferopol: Mandarin Printing House. 2024:1-72 (in Russian).
23. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Molecular Biology. 1985;19(1):69-76. DOI 10.1007/bf00020088.
24. Miljanić V., Rusjan D., Škvarč A., Chatelet P., Štajner N. Elimination of eight viruses and two viroids from preclonal candidates of six grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) through *in vivo* thermotherapy and *in vitro* meristem tip micrografting. Plants. 2022;11(8):1064. DOI 10.3390/plants11081064.
25. Fust C., Lameront P., Shabanian M., Song Y., Kubaa R.A., Bester R., Maree, H.J., Al Rwahnih M., Meng B.,

- Ollat N. *Grapevine leafroll-associated virus 3*: a global threat to grapevine and wine industries but a gold mine for scientific discovery. *Journal of Experimental Botany*. 2025;76(11):2985-3000. DOI 10.1093/jxb/eraf039.
26. Song Y., Hanner R.H., Meng B. Probing into the effects of grapevine leafroll-associated viruses on the physiology, fruit quality and gene expression of grapes. *Viruses*. 2021;13(4):593. DOI 10.3390/v13040593.
27. Дорошенко Н.П. Цикл «введение в культуру *in vitro* – микроразмножение» у сортов винограда: Ледяной, Золотце, Мускат Аксайский // *Русский виноград*. 2021;16:3-10. DOI 10.32904/2712-8245-2021-16-3-10. Doroshenko N.P. Cycle "introduction to *in vitro* culture – micro-propagation" of vine varieties: Ledyanoy, Zolotce, Muscat Aksaiskiy. *Russian Grapes*. 2021;16:3-10. DOI 10.32904/2712-8245-2021-16-3-10 (*in Russian*).
28. Khassein A., Suleimanova G., Malakhova N., Kizildeniz T. Grapes recovery from *grapevine fan leaf virus* by chemotherapy using salicylic acid. *Research On Crops*. 2024;25(4):605-610. DOI 10.31830/2348-7542.2024.ROC-1144.
29. Smriti A., Vikram S., Afreen A., Afaq Q. A mini-review on electrotherapeutic strategy for the plant viral elimination. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 2022;150(3):1-15. DOI 10.1007/s11240-022-02265-w.
30. Bhat A.I., Rao G.P. Virus elimination through somatic embryogenesis. *Characterization of plant viruses*. 2020:479-489. DOI 10.1007/978-1-0716-0334-5_48.
31. Bettoni J.C., Marković Z., Bi W., Volk G.M., Matsumoto T., Wang Q.-C. Grapevine shoot tip cryopreservation and cryotherapy: Secure storage of disease-free plants. *Plants*. 2021;10(10):2190. DOI 10.3390/plants10102190.

Информация об авторах

Виктор Павлович Клименко, д-р с.-х. наук, ст. 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: lea_rs@mail.ru; <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/0000-0002-3363-8292>;

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: grigorenkomary17@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8565-0082>;

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

Елена Николаевна Спотарь, мл. науч. сотр. лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: Elen_persic@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3050-8505>;

Анна Алексеевна МIRONENKO, вед. инженер лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: annushka.shikhova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0001-2947-6462>;

Евгения Павловна Пахомова, инженер лаборатории молекулярно-генетических исследований; e-мэйл: dublinstar@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-6085-0780>.

Information about the authors

Viktor P. Klimenko, Dr. Agric. Sci., Senior 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: lea_rs@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5695-5936>;

Irina A. Pavlova, Cand. Biol. 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/0000-0002-3363-8292>;

Valery A. Zlenko, Cand. Agric. Sci., Associate 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: grigorenkomary17@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8565-0082>;

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

Elena N. Spotar, Junior Staff Scientist, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: Elen_persic@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3050-8505>;

Anna A. Mironenko, Leading Engineer, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: annushka.shikhova@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0001-2947-6462>;

Evgeniya P. Pakhomova, Engineer, Laboratory of Molecular Genetic Research; e-mail: dublinstar@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-6085-0780>.

Статья поступила в редакцию 02.07.2025, одобрена после рецензии 14.08.2025, принята к публикации 20.08.2025.