

УДК 634.8.037:581.143

UDC 634.8.037:581.143

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**БИОТЕХНОЛОГИЯ – НАУКА И ОТРАСЛЬ  
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА****BIOTECHNOLOGY – SCIENCE AND SECTOR  
OF AGRICULTURE**

Дорошенко Наталья Петровна  
д.б.н., профессор  
заведующая лабораторией биотехнологии  
*Всероссийский НИИВиВ им. Я.И.Потапенко,  
Новочеркасск Ростовской обл., Россия*

Doroshenko Natalya Petrovna  
Dr.Sci.Biol., Professor  
Head of the Laboratory of Biotechnology  
*All-Russian VNIViV of Ya.I.Potapenko,  
Novocherkassk, Rostov region., Russia*

Трошин Леонид Петрович  
д.б.н., профессор

Troshin Leonid Petrovich  
Dr.Sci.Biol., professor

Алзубайди Хайдар Клиль Ибрахим  
магистрант  
*Кубанский государственный аграрный универси-  
тет, Краснодар, Россия*

Alzubaidi Khaidar Klil Ibrahim  
Magister student  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar,  
Russia*

В статье представлены сведения об особенностях **биотехнологии** как движущей силы научно-технического прогресса. В национальных программах ведущих стран мира она является одной из приоритетных отраслей, отражающих уровень социально-экономического состояния общества. Биотехнология сейчас успешно решает такие жизненно важные задачи как обеспечение продовольствием, создание эффективных лекарств, получение топлива на основе возобновляемого сырья, поддержание экологического равновесия, сохранение биоресурсов Земли. Развитие сельского хозяйства в современных условиях немыслимо без агробиотехнологии. Это имеет непосредственное отношение и к виноградарству. Выбирая в качестве объекта интегрированную систему (зародыши, апикальную меристему, пазушные почки), можно клонировать растения, т.е. получать растения, идентичные исходному. Если же в качестве объекта использовать изолированные клетки или протопласты, то в этом случае с большой вероятностью возникнут измененные варианты, что создает разнообразие для селекционера. **Генетическая инженерия** – наука более молодая, со времени создания первой химерной молекулы ДНК. Зарождение генетической инженерии уходит корнями в развитие молекулярной генетики, биохимии. Эти технологии, вне всякого сомнения, прогрессивны, однако, их биологическая безопасность до сих пор недостаточно исследована и представляет опасность для всего живого на Земле. В ведущих западных державах осуществляется жесткий контроль над внедрением трансгенных растений в растениеводство, так как они несут в агроценоз новые биологические риски, которые могут отрицательно влиять на растения, животных и организм человека. В России, так же как в других странах, уже принят закон «О государственном регулировании генно-инженерной деятельности»

This article presents information about the features of biotechnology as the driving force of scientific and technological progress. The national programs of the leading countries of the world, it is one of the priority sectors, reflecting the level of the socio-economic condition of the society. Biotechnology is now successfully solves such vital tasks as providing food, the establishment of effective medicaments, obtaining fuel based on renewable raw materials, maintaining ecological balance, conservation of biological resources of the Earth. The development of agriculture in modern conditions is impossible without agricultural biotechnology. It is directly related to viticulture. Choosing an object of an integrated system (embryos, apical meristem, axillary buds), it is possible to clone plants, i.e. produce plants identical to the original. If the same as the object to use isolated cells or protoplasts, in this case, there will most likely altered versions, creating diversity for the breeder. Genetic engineering – the science of younger, since the establishment of the first chimeric DNA molecule. The origin of genetic engineering is rooted in the development of molecular genetics, biochemistry. These technologies, undoubtedly progressive, but their biological safety is still insufficiently explored and is a danger to all life on Earth. The leading Western powers carried out strict control over the introduction of transgenic crop plants, as they are in agroecosis new biological risks that may adversely affect the plants, animals and humans. In Russia, as in other countries, have already adopted the law “State regulation of genetic engineering”

Ключевые слова: БИОТЕХНОЛОГИЯ, ГЕНОИНЖЕНЕРИЯ, РАСТЕНИЕВОДСТВО, ВИНОГРА-

Keywords: BIOTECHNOLOGY, GENETIC ENGINEERING, PLANTBREEDING, VITICULTURE,

## Введение

Общие тенденции развития мировой экономики определяют роль биотехнологии как движущей силы научно-технического прогресса. В национальных программах ведущих стран мира биотехнология является одной из приоритетных отраслей, отражающих уровень социально-экономического состояния общества.

Биотехнология сейчас успешно решает такие жизненно важные задачи как обеспечение продовольствием, создание эффективных лекарств, получение топлива на основе возобновляемого сырья, поддержание экологического равновесия, сохранение биоресурсов Земли.

Мир переживает глобальный биотехнологический бум. К сожалению, сейчас доля Российской Федерации в мировом объеме биотехнологической продукции не превышает 0,2, в то время как доля США составляет 42%, Евросоюза – 22%, Китая – 10%, Индии – 2%.

Биотехнология, как интегральная отрасль, может стать базой успешного выполнения приоритетных национальных проектов. Развитие сельского хозяйства в современных условиях немыслимо без агrobiотехнологии. Это имеет непосредственное отношение и к виноградарству.

Многие исследователи называют наступивший век веком биотехнологии и генетической инженерии, а биотехнологию определяют как область знаний, на основе которой посредством управляемого культивирования организмов и или их фрагментов (тканей, клеток) получают полезные для человека продукты: пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, средства защиты растений и животных, а также утилизируют различные органические отходы.

Основные индукторы развития биотехнологии – это радикальные технологические инновации, экономическая конкурентоспособность и рас-

тущий экономический спрос. Биотехнология представляет собой наглядный пример радикальной инновации. Она настолько универсальна, что отрасли промышленности, которые ранее не использовали живые организмы или их композиты в своем производстве, теперь широко применяют их. Полагают, что биотехнология способна решить такие глобальные проблемы как снижение заболеваемости, недоедание, загрязнение окружающей среды. С помощью биотехнологических методов можно обеспечить стабилизацию промышленности, сельского хозяйства, создать новые конкурентоспособные рынки и дополнительные рабочие места.

Биотехнология (биологическая технология) включает в себя два, казалось бы, несовместимых понятия – промышленность и биологию. Наиболее всеобъемлюще функцию биотехнологии можно охарактеризовать как целенаправленное превращение материи (и энергии) с помощью организмов.

Термин «биотехнология» впервые использовал венгр Карл Эреки в 1919 году для обозначения работ, в которых продукты получают с помощью живых организмов. В биологическом энциклопедическом словаре биотехнологией называют использование живых организмов и биологических процессов в производстве. Европейская Федерация биотехнологии (EFB) определяет современную биотехнологию как использование наук о природе (биологии, химии, физики) и инженерных наук (например, электроники) применительно к биосистемам в биоиндустрии, а Европейская комиссия (ЕС) дополняет – для того, чтобы снабдить биологическое сообщество требуемыми продуктами и услугами.

Последние десятилетия характеризуются выдающимися достижениями в биотехнологии, являющейся междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике. Применение новых методов и значи-

тельные успехи, достигнутые во второй половине XX века в фундаментальных исследованиях, создали предпосылки для развития биотехнологии.

### ***Что же такое биотехнология растений?***

В свете современных представлений биотехнология растений – это соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и техникой рекомбинантных ДНК.

Культивируемые клетки и ткани высших растений обладают рядом уникальных особенностей, отличающих их от клеток животных и микроорганизмов, что и позволяет их широко использовать. Во-первых, их можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы (каллус), способной к синтезу видоспецифичных хозяйственно-важных соединений, и заменять ими растительное сырьё, получаемое от растений *in vivo*. Во-вторых, по желанию экспериментатора, можно с помощью нехитрых манипуляций заставить изолированные клетки образовывать растения–регенеранты. Выбирая в качестве объекта интегрированную систему (зародыши, апикальную меристему, пазушные почки), можно клонировать растения, т.е. получать растения, идентичные исходному. Если же в качестве объекта использовать изолированные клетки или протопласты, то в этом случае с большой вероятностью возникнут измененные варианты, что создает разнообразие для селекционера.

### ***Что может дать биотехнология сельскому хозяйству?***

Все новые клеточные технологии можно разделить на две группы [4]: I – ускоряющие и облегчающие традиционный процесс сельского хозяйства; II – создающие генетическое разнообразие и позво-

ляющие путем селекции на уровне соматических клеток проводить скрининг генотипов с важными сельскохозяйственными признаками:

I группа	II группа
Оплодотворение <i>in vitro</i>	Использование самоклональных вариантов
Культура незрелых гибридных семян и зародышей (постгамная несовместимость)	Индукцированный мутагенез и клеточная селекция на основе соматической изменчивости и индивидуальный морфогенез
Регенерация растений из тканей летальных гибридов	Гибридизация соматических клеток
Экспериментальная гаплоидия	Перенос цитоплазматических клеток
Клональное микроразмножение новых сортов, гибридов, линий	Генная инженерия – перенос чужеродных генов
Криосохранение генофонда	Клеточные культуры как продуценты

Биотехнология объединяет два направления: клеточную и генетическую инженерию. Из сказанного выше ясно, что в процессе культивирования можно осуществлять различные манипуляции с клетками и получать растения с новыми наследственными свойствами. Поэтому это направление получило название «клеточная инженерия».

**Генетическая инженерия** – наука более молодая, датой её рождения считают 1972 год, когда была создана первая химерная молекула ДНК. Зарождение генетической инженерии уходит корнями в развитие молекулярной генетики, биохимии. Эти технологии, вне всякого сомнения, прогрессивны, однако, их биологическая безопасность до сих пор недостаточно исследована и представляет опасность для всего живого на Земле. В ведущих западных державах осуществляется жесткий контроль

над внедрением трансгенных растений в растениеводство, так как они несут в агроценоз новые биологические риски, которые могут отрицательно влиять на растения, животных и организм человека. В России, так же как в других странах, уже принят закон «О государственном регулировании генно-инженерной деятельности».

В последние годы наблюдалось противодействие генетически модифицированным продуктам питания (ГМП). Сторонники сельскохозяйственной биотехнологии рассматривают её как ключ к дальнейшему развитию систем ведения сельского хозяйства, обеспечивающий усиление безопасности качества продовольствия в сравнении с современными системами, базирующимися на интенсивном применении химических продуктов. Критики же рассматривают производство ГМП как угрозу биологическому разнообразию растений и выживаемости населения.

Быстрыми темпами происходит развитие сельскохозяйственной биотехнологии в США. Проведено 400 полевых испытаний трансгенных вирусостойчивых растений. При этом отсутствовали сообщения о негативном их воздействии на окружающую среду. Приведены данные по полевым испытаниям вирусостойчивых генотипов свеклы, огурца, винограда, дыни, овса, папайи, гороха, перца сладкого, картофеля, малины, сои, табака, томата, арбуза, пшеницы с указанием генов и донора устойчивости к вирусам. Получено разрешение федеральных властей США на выращивание в производственных условиях ряда трансгенных фенотипов этих культур.

На V Международном симпозиуме рассматривались вопросы сельскохозяйственной биотехнологии и внедрения в производство генетически модифицированных микроорганизмов в Великобритании, странах Центральной и Восточной Европы, Мексике, Китае, Японии.

Ученые многих стран рассматривают положение о генной инженерии в виноградарстве и её перспективы на будущее. Отмечают, что противовирусной устойчивостью винограда занимаются рабочие группы в Гер-

мании, Франции, Австрии, Швейцарии, Италии и США. Преимущество генной инженерии над классической селекцией состоит в большей целенаправленности и скорости, а также меньшей затратности и большом наборе генов для манипулирования. Ведутся также работы по противогрибной устойчивости винограда с применением генной инженерии.

В последние годы создание трансгенных форм растений идет быстрыми темпами. Весьма перспективной является научно-исследовательская работа по созданию трансгенного винограда, устойчивого к отдельным вирусам, в первую очередь, к короткоузлию винограда. Однако она ещё не имеет практических результатов для промышленного виноградарства. Кроме этого, при создании трансгенных растений возможен риск отрицательных последствий таких организмов для человека и окружающей среды.

**Клеточная инженерия** – одно из более важных направлений в биотехнологии. Она основана на использовании принципиально нового объекта – изолированной культуры клеток или тканей (выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях), а также на тотипотентности – уникальном свойстве растительных клеток. Применение этого объекта раскрыло большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач.

Бурное развитие клеточной инженерии приходится на 50-е годы прошлого века, хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. Настоящее развитие метода культуры и клеток высших растений началось в 1932 году с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта.

Пионерами в культуре тканей винограда можно считать французских исследователей G. Morel, L. Fallot, R. Galzy. G. Morel [38] первый стал культивировать стеблевую ткань винограда *in vitro*. В дальнейшем иссле-

дования в области изолированных тканей и органов винограда развивались быстрыми темпами.

Обзор научных сообщений по культуре органов, тканей и клеток винограда *in vitro*, сделанный А.И. Литваком и А.П. Кузьменко [10], показал широкие потенциальные возможности метода. Сегодня можно с уверенностью заключить, что методы культуры органов, тканей и клеток *in vitro* занимают прочное место в арсенале средств, определяющих значительный прогресс в селекции винограда и в деле производства посадочного материала этой древнейшей и широко распространенной культуры.

В 1978 г. приступили к исследованиям по культуре тканей (по инициативе Н.И. Гузуна) в отделе селекции и генетики МолдНИИ виноградарства и виноделия НПО «Виерул».

Во ВНИИВиВ «Магарач» П.Я. Голодрига, В.А. Зленко и др. [7-8], в связи с острой проблемой ускоренного размножения новых сортов и клонов винограда, устойчивых к болезням и вредителям, ранних сроков созревания, разработали технологию ускоренного размножения винограда с использованием культуры изолированной ткани.

В Чечено-Ингушетии также была создана лаборатория клонального микроразмножения, которая осуществляла практическое размножение перспективных сортов винограда.

По инициативе И.А. Кострикина и Б.А. Музыченко в 1983 году приступили к исследованиям по культуре тканей во Всероссийском НИИ виноградарства и виноделия им. Я.И. Потапенко в лаборатории физиологии и биохимии растений, которая затем была реорганизована в лабораторию биотехнологии.

## **КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ: ДОСТОИНСТВА, ЭТАПЫ, НЕОБХОДИМЫЕ УСЛОВИЯ**

Интерес к теоретическим и прикладным аспектам культуры тканей и клеток растений иллюстрируется быстрым ростом числа публикаций, увеличением числа международных и региональных конгрессов, совещаний, числа их участников.

В нашей стране работы по культуре тканей и клеток растений были начаты в 1957 году в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева. Теоретические основы культуры изолированных тканей изложены в монографии Р.Г. Бутенко [4].

Метод размножения растений с использованием техники изолированных тканей и органов привлекает внимание физиологов, вирусологов, селекционеров, а также практиков и, в первую очередь, питомниководов. Причин этому несколько. Прежде всего, сейчас ни у кого не осталось сомнения, что именно этот способ (обозначаемый как клональное микроразмножение или просто микроразмножение) на сегодняшний день позволяет полнее всего реализовать потенциал растительного организма к размножению. Это направление в культуре тканей быстро развивается и является чрезвычайно перспективным. По сравнению с традиционными методами размножения, используемыми в сельскохозяйственной практике, клональное микроразмножение в культуре *in vitro* обладает рядом преимуществ:

- 1) коэффициент размножения в этом случае гораздо выше, чем при обычных методах размножения,
- 2) можно быстро размножить ценный клон растения,
- 3) одновременно с размножением часто происходит оздоровление растений от вирусов, патогенных микроорганизмов и нематод,
- 4) возможно, работать в лабораторных условиях круглый год и планировать выпуск растений к определенному сроку,

5) метод размножения очень экономичен - на первоначальном этапе тысячи растений могут расти на относительно небольшой лабораторной площади,

б) этим методом можно размножать растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно,

7) можно длительно хранить пробирочные растения при пониженной температуре, что позволяет создать «банк» ценных форм растений.

**Основное преимущество клонального микроразмножения** – это получение генетически однородного, **безвирусного посадочного материала**, так как вирусные и микоплазменные заболевания в силу хронического характера наносят виноградарству постоянный экономический ущерб.

### **Вредоносность вирусных инфекций для винограда**

Вирусным инфекциям подвержены практически все виды растений, в том числе и важные сельскохозяйственные культуры. В некоторых случаях потери урожая вследствие вирусных инфекций могут достигать 50-80%. Постоянный экономический ущерб они наносят и виноградарству.

Как следует из обзора П. Абрашевой [2], вирусы, размножаясь в растительных клетках и используя их для своей репродукции, вызывают нарушения в обмене веществ хозяина.

Содержание хлорофилла в листьях больного винограда понижается, что, вероятно, объясняется подавлением процессов синтеза этого пигмента. Уменьшение количества хлорофилла влияет на фотосинтетическую активность листьев. Влияние на интенсивность фотосинтеза оказывает и нарушение водного режима больных растений, в результате которого наступают изменения в составе протоплазменных биокolloидов, что, по мнению Б. Рубина [17], является важным фактором процесса ассимиляции. Исследованиями Б. Милкуса и С. Стыцко [13], Б. Милкуса и Н. Еремеевой [12] установлено, что в результате заражения растений винограда вирусами происходят изменения в белковом обмене и минеральном питании (рис. 1).



А

Б



В



Г

Рис. 1 – Визуальные признаки вирусных заболеваний винограда: А – желтая мозаика (Grapevine Yellow mosaic virus); Б – окаймление жилок (Grapevine vein banding virus); В – скручивание листьев винограда (Grapevine Leafroll virus); Г – золотистое пожелтение – (Flavescence doree) на белых и красных сортах винограда.

Фотографии предоставлены В.В. Бондарчуком (НИ ВиВ Республики Молдова)

Снижается интенсивность синтеза белка в листьях больных растений в 1,6 раза по сравнению со здоровыми растениями. Y. Cook, A. Goheen [27], на основании полученных данных, пришли к выводу, что вирус скручивания листьев нарушает нормальное распределение калия между пластинкой и черешком, изменяя уровень магния и кальция, как и взаимоотношения между этими тремя элементами.

Нарушения процесса обмена веществ ведут к задержке роста побегов. Кусты винограда, зараженные вирусом короткоузлия, вирусом борозчатости древесины, вирусом скручивания листьев, весной развиваются значительно позже. Подавление роста и постепенное редуцирование надземной части зараженных вирусами виноградных растений до полной их гибели – наиболее общий симптом, на который указывают исследователи, работавшие и работающие в этой области.

На фотосинтетическую активность листьев также оказывает влияние состояние корневой системы, которая у зараженных вирусами растений развита намного слабее, чем у здоровых. Она редуцирована как в горизонтальном, так и в вертикальном направлениях. Общая длина корней у здоровых кустов больше, чем у больных, примерно, в три раза с половиной. При этом у зараженных растений значительная часть питающих корней (22,6%) расположена совсем близко к поверхности почвы (0-40 см), что является одной из причин большой чувствительности больных растений к колебаниям температуры и засухе.

Нарушая ход физиологических процессов, вирусы, в конечном счете, оказывают влияние на количество и качество продукции. П. Абрашева [1-3] приводит данные многочисленных исследований (Goheen и Cook [32]; Vanek, [41]) о снижении урожая у сортов Шардоне, Мускат белый, Пино черный, Болгар при заражении их вирусом короткоузлия на 50,0-90,0%.

Кроме общего снижения урожая винограда, при вирусных болезнях наблюдается и сильное ухудшение его качества. У столовых сортов сни-

жение качества приводит к невозможности использовать их по назначению: на потребление в свежем состоянии, а винные сорта дают нетипичные для сорта вкусовые качества вина. Качество вина, полученного из винограда, зараженного вирусами, ухудшается. По мнению G. Vanek [41], получают отклонения в букете и гармоничности. П. Абрашева и И. Чалков [1] установили, что вино, полученное из винограда сорта Каберне-Совиньон, зараженное скручиванием листьев, беднее алкоголем и безсахарным экстрактом. Ниже у него и содержание азотных, дубильных и красящих веществ. При дегустационной оценке вино охарактеризовано как нетипичное для сорта, недостаточно окрашенное, с острой кислотностью, слабым ароматом и негармоничным вкусом.

Таким образом, больные растения в большинстве случаев снижают количество и качество урожая, сильно страдают от неблагоприятных условий внешней среды. Ослабленные кусты нередко преждевременно усыхают, вызывая раннюю изреженность виноградников.

Наиболее полно результаты изучения вирусных болезней винограда были отражены в книге Т.Д. Вердеревской и В.Г. Маринеску в 1985 году [5]. Исследования последних 20 лет привели к существенному расширению представлений о вирусах и вирусных болезнях винограда. За это время учеными виноградарских стран опубликовано более двух тысяч работ, отражающих результаты изучения вирусных болезней. Такое внимание к исследованиям в данном направлении связано не только с актуальностью проблемы для мирового виноградарства, но и с расширением методической базы.

Н.А. Мулюкина обобщила в 2005 году [14] основные достижения за последние 20 лет в области изучения вирусных болезней и бактериального рака винограда в странах бывшего СНГ и за рубежом. Ею отмечается, что в настоящее время у винограда насчитывается 55

вирусов, относящихся к 20 различным видам, и отражена возможность практического применения полученных результатов в виноградарстве.

### **Способы борьбы с вирусной инфекцией**

Химическими средствами защиты вирусы не могут быть устранены без одновременного поражения самой клетки. Агротехнические приёмы являются вспомогательными в снижении вредного влияния вирусных болезней, а их положительное воздействие на биохимические, физиологические и агробиологические показатели пораженных вирусами растений неспецифично и непродолжительно.

В последние два десятилетия быстрыми темпами идет создание трансгенных форм растений. Весьма перспективной является научно-исследовательская работа по созданию трансгенного винограда, устойчивого к отдельным вирусам, в первую очередь, к короткоузлию винограда. Однако она ещё не имеет практических результатов для промышленного виноградарства. Кроме этого, при создании трансгенных растений возможен риск отрицательных последствий таких организмов для человека и окружающей среды.

Применявшиеся ранее методы борьбы с вирусами – отбор внешне здоровых растений и термотерапия оказались неэффективными против латентных и термостойких вирусов. Также выявлено, что виноград передает вирусы потомству при семенном размножении, и сорта постепенно отягощаются грузом вирусных инфекций. Кроме этого, основные сорта винограда характеризуются высоким уровнем гетерозиготности, вследствие чего семенное размножение их с сохранением сортовой чистоты практически невозможно. Другой проблемой, возникающей при размножении многолетних растений семенами, является то, что полученные сеянцы очень долго сохраняют ювенильность, то есть, не вступают в стадию плодоношения. Общепринятые способы вегетативного размножения передают потомству

хронические заболевания (вирусные, микоплазменные, бактериальные и др.).

Вирусные и бактериальные болезни винограда являются хроническими и системными, поэтому вегетативное потомство больных кустов оказывается зараженным. Наиболее опасна для размножения – возможность латентного периода развития этих заболеваний, когда растения несут возбудителей без внешних симптомов проявления болезней. Заготовка лозы для размножения от таких кустов приводит к выращиванию больных саженцев.

Так как химическая борьба с хроническими заболеваниями до настоящего времени малоэффективна, то единственно правильное направление в борьбе с ними – получение здорового материала и размножение его в условиях, исключающих вторичное заражение. Свободный от хронических заболеваний материал должен отличаться от обычной чистосортности, большей продуктивностью, высоким качеством урожая, быть сертифицированным.

Получить сертифицированный посадочный материал можно в результате клоновой и фитосанитарной селекции, отбирая визуально здоровые кусты и тестируя их на наличие вирусных болезней.

Однако в практике производства безвирусного материала винограда при отборе растений бывают случаи, когда клон поражен на 100% одним или несколькими вирусами. В настоящее время у винограда насчитывается 55 вирусов. В последние годы участились случаи распространения фитоплазм винограда. Во Франции в долине Роны, как отмечают R. Sforza, D. Clair [19] наблюдалась эпидемия почернения побегов винограда. Установлена связь этого заболевания с желтухой винограда в Германии. Похожее заболевание обнаружено и на наших виноградниках.

Наличие переносчиков вирусов и фитоплазм обостряет проблему до такой степени, что многие сорта винограда могут оказаться полностью за-

раженными рядом вирусных заболеваний. Это определяет потребность в базисном посадочном материале, который является основой сертифицированного посадочного материала и должен быть свободным от карантинных объектов и возбудителей хронических заболеваний (вирусных, микоплазменных, бактериальных и других).

### **Основной способ борьбы с вирусной инфекцией**

Основной способ защиты от вирусов – использование превентивных мер – это получение здорового посадочного материала и предохранение его от вторичного заражения. В связи с этим основным направлением борьбы с этими заболеваниями является перевод питомниководства на безвирусную основу и ведение системы сертификации посадочного материала по образцу большинства европейских стран.

В настоящее время проблема борьбы с вирусными болезнями, а также поддержания и хранения коллекционного генофонда, решается с помощью культуры апикальных меристем и клонального микроразмножения *in vitro* (Муромцев, Бутенко [15]; Шевелуха [20]). Оздоровление от вирусов связано со многими факторами: генотипом образца, особенностями вирусов и характером их взаимодействия с растением хозяином, размером изолированных меристем, наконец, с условиями культивирования. До сих пор не совсем ясен механизм освобождения от вирусной инфекции: имеет место своего рода отбор (клоновый) на клеточном уровне или хемотерапевтический эффект самой культуры тканей. Поскольку известно, что вирусы способны проникать в зону меристем (Винклер, Бутенко [6]; Крылова, Степаненко [9]), то предполагаемые возможности освобождения от них меристематических растений можно свести к двум основным версиям: селективной и метаболической. Первая предполагает наличие действительно свободной от вирусов клеточной зоны, вследствие ухода от них активно делящихся меристематических клеток в точках роста. Вторая основывается на том, что это может быть связано не столько с опережающими темпами

их деления, сколько с заблокированным размножением и затрудненным транспортом вирусов в меристемной зоне, где повышена гормональная активность и отсутствует развитая проводящая система. Чтобы повысить эффективность оздоровления от вирусной инфекции, применяют дополнительные антивирусные воздействия.

В 1952 году Морель и Мартен [38] установили, что эффективные результаты дает культивирование меристематических верхушек в асептических условиях на искусственных средах. Авторы установили, что вирус не может существовать в клетках меристемы. Это объясняется их физиологическими особенностями, в частности, высокой концентрацией ауксинов, отсутствием необходимых для размножения вирусов субстратов, высокой способностью клеток меристемы к размножению. Перечисленные факторы стимулируют синтез нормальных нуклеотидов, что способствует успешной конкуренции с вирусными болезнями и даже подавлению репродукции вируса.

R. Galsy [31] получены положительные результаты при культивировании на питательных средах меристем *Vitis rupestris*. G. Bini [26] удалось культивировать с положительным результатом меристемы *Vitis vinifera*. Однако экспланты слабо развивались, проявляли слабую дифференциацию, и число полученных саженцев было ограниченным. Небольшое число удачных опытов при культуре меристем на целом ряде сортов получено у американского ученого H.S. Adwinski [21].

В Австралии M. Barlass, K. Skene [23] первыми применили простой и быстрый метод, позволяющий развивать промышленное производство посадочного материала в виноградарстве, работая с фрагментом меристемы величиной около 1 мм с двумя-тремя листовыми зачатками.

Следует отметить работы P.L. Monette [37] в Канаде; G. Corte и Mendonco [28] в Португалии; N. Jaco [33] в Венгрии; N. Duran-Yila и др. [29] в Испании; С. Панделиева, С. Крстановой, В. Ковачева [16], П.И. Аб-

рашевой и др. [3], И. Маленина и др. [11] в Болгарии; В. Altmayer [22], Staud, Н.Н. Kassemeyr [40] в Германии, которые отмечают возможность получения растений винограда, свободных от вирусов, через культуру меристем.

В то же время есть ученые, которые считают, что получение вирусосвободного растительного материала из инфицированных растений является надежным при термотерапии, сочетании термотерапии с культурой меристемы – это М. Barlass, К. G. M. Skene [25], Kusmanovik Slobodan, Gavran Mira [34]; G. Fannisa, L. Rieciardi [30].

Существует мнение (Муромцев, Бутенко [15], что применение термотерапии в ряде случаев приводит к отставанию в росте и деформации органов меристемных растений. Известно, что применение к тканям или органам растений температур, приближающихся к границе выживания, ведет зачастую к мутациям. Для проведения термотерапии необходимы специальные дорогостоящие камеры, оборудованные вытяжкой и проточной вентиляцией. Метод получения оздоровленного посадочного материала при помощи термотерапии не всегда позволяет избавиться от вирусной или фитоплазменной инфекции, особенно в тех случаях, когда речь идет о термостабильных патогенах.

Положительные характеристики безвирусного материала, полученного методом культуры меристем, приводят Т. Sakurai, К. Takei, А. Harado [39], А. Deloire, М. Charpentier, G. Berlioz [36], М. Barlass [24] и др. и рекомендуют этот метод для промышленного питомниководства, в частности, для создания маточных насаждений. Установлено, что виноградные растения, полученные методом *in vitro*, оказались более устойчивыми к морозам, включая весенние заморозки, более мощными, с мощной корневой системой, трехлетние кусты на виноградниках Дижона дали обильный и высококачественный урожай.

В.А. Самусь и др. [18] отмечают, что, несмотря на высокую стоимость посадочного материала, размноженного в культуре *in vitro*, во всем мире маточники закладываются именно такими саженцами. Высокое качество таких маточников оправдывают затраты, они окупаются при последующей эксплуатации. С размноженных *in vitro* маточных растений получают в два раза больше саженцев, причем их качество выше, чем у растений, размноженных традиционными способами, и, что немаловажно, такая тенденция сохраняется в последующие годы.

Существует возможность приобретения сертифицированных саженцев в странах с развитым виноградарством. Отсутствие в этих странах сортов, традиционно возделываемых в наших регионах, существенно осложняет эту задачу. Кроме этого, существует также опасность завоза новых болезней и вредителей, способных нанести огромный ущерб сельскохозяйственному производству. Поэтому необходимо иметь сертифицированный посадочный материал отечественного производства.

Основной способ защиты от вирусов – использование превентивных мер. Это получение здорового посадочного материала и предохранение его от вторичного заражения. В связи с этим основным направлением борьбы с этими заболеваниями является перевод питомниководства на безвирусную основу и ведение системы сертификации посадочного материала по образцу большинства европейских стран.

### **Система сертификации посадочного материала**

Система сертификации (сертификационная схема) посадочного материала винограда, действующая в странах Европейского Союза, базируется на четких организационных схемах, установленных технологических требованиях и нормативных документах. По международному определению, сертификационная схема представляет собой систему производства посадочного материала, получаемого из отобранных клонов через несколько стадий размножения, в условиях, обеспечивающих соблюдение

санитарных стандартов, для посадки, с целью закладки маточников и промышленных виноградников.

Посадочный материал винограда большинства европейских стран подразделяется на три официальных категории: исходный клоновый, базовый и сертифицированный. «Предбазовый» материал (Nuclear stock) – это коллекция безвирусных клонов, растения которой используются для создания «базового» материала – второй ступени размножения сертифицированного посадочного материала. «Базовый материал» (Propagation stock) – это материал, который сохраняется в строго контролируемых условиях и служит для создания «сертифицированного» материала. «Сертифицированный» материал (Certified stock) – это материал, который может быть использован как для закладки сертифицированных маточников, так и для закладки плодоносящих насаждений. Посадочный материал, полученный в результате размножения сертифицированного материала, сохраняет свой фитосанитарный статус.

Посадочный материал винограда категорий: исходный клоновый, базовый и сертифицированный (согласно правилам Евросоюза) должен отвечать следующим требованиям:

- клоновое происхождение;
- отсутствие скрытого поражения вирусами короткоузлия, первым и третьим серотипами вируса скручивания листьев винограда, вирусом мраморности, а также вирусами А и В винограда;
- отсутствие визуального поражения болезнями многолетней древесины.

В большинстве стран – участниц Международной организации виноградарства и виноделия производство виноградных саженцев основано на сертификации исходного черенкового подвойного и привойного материала и самих саженцев.

Сертификационные схемы посадочного материала разных стран имеют ряд особенностей. Санитарная селекция (сертификация) регламентирует освобождение, в первую очередь, от наиболее вредоносных вирусов – короткоузлия и скручивания листьев. По фитосанитарному состоянию такой посадочный материал относится к категории – тестированный на вирусы (Virus tested) – материал, свободный от особо опасных вирусов и вирусоподобных патогенов.

Вторую категорию представляет посадочный материал, свободный от вирусов (Virus free) – материал, свободный от всех известных вирусов и вирусоподобных заболеваний.

Проведение санитарной селекции в Германии началось в 30-е годы (Y. Schoffling, Sttelmach [30]).

Во Франции в 1946 году начала работать секция, которая поставила своей целью освобождение посадочного материала винограда от инфекционного вырождения. В 1952 году G. Morel, C. Martin показали [38], что эффективные результаты оздоровления от вирусов дает культивирование меристематических верхушек в асептических условиях на искусственных питательных средах. Это подтверждено в исследованиях R. Galsy, G. Bini [26, 31].

В Италии программы клоновой и санитарной селекции были начаты в начале 60-х годов несколькими исследовательскими учреждениями. С 1976 года отдельные попытки в этом направлении координировались Национальным научным советом, Министерством сельского хозяйства и лесов. Целью этой деятельности было проведение клоновой и санитарной селекции привойных и подвойных сортов, производство здорового посадочного материала методами термотерапии и культуры меристемы.

В Европе в 1985 году была создана организация ЕРРО, которая состоит из экспертов различных стран, заинтересованных в производстве здорового посадочного материала. Системы сертификации винограда су-

ществуют также в США, Канаде, Австралии и Новой Зеландии. Одним из их отличий является преимущественное внимание к санитарной селекции, которая регламентирует освобождение в первую очередь от наиболее вредоносных вирусов.

Более высокую категорию представляет посадочный материал (*Virus free*), свободный от всех известных вирусов и вирусоподобных заболеваний, полученный в результате устранения возбудителей из тканей больных растений. В лаборатории биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко разработана технология оздоровления растений при помощи культуры апикальных меристем, защищенная 13 патентами, которая позволяет получать оздоровленный базовый материал категории (*Virus free*), являющийся основой сертифицированного посадочного материала.

#### **Схема производства оздоровленного посадочного материала винограда**

Получение безвирусного посадочного материала методами оздоровления и тестирования (базисный, класс А, супер–суперэлита) – лаборатория биотехнологии ВНИИВиВ им. Я. И. Потапенко.

Создание банка оздоровленного генофонда в культуре *in vitro*, лаборатория биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко.

Первичное размножение оздоровленных клонов (базисный, класс А, супер–суперэлита) – лаборатория биотехнологии ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко, Центр предварительного размножения базисного посадочного материала класса А (Нижне-Кундрюченское отделение опытного поля ВНИИВиВ им. Я.И. Потапенко).

Маточки размножения в базовых питомниководческих хозяйствах для получения сертифицированного посадочного материала (класс Б, супер элита).

Плодоносящие насаждения – сертифицированный посадочный материал класса Б, категории элитный и сортовой (рядовой).

Массовое размножение может осуществляться в государственных и частных питомниководческих хозяйствах, объединенных также в систему, способную обеспечивать гарантированное качество выпускаемого посадочного материала, его фитосанитарное состояние и чистосортность.

Основу базового посадочного материала составляют растения, которые в силу генетического потенциала, отсутствия латентной инфекции обладают преимуществами в росте, развитии, толерантности к неблагоприятным условиям внешней среды, в выходе стандартных черенков и урожайности по сравнению с исходными растениями.

### **Схема оздоровления сортов винограда от вирусов при помощи биотехнологических методов**

1. Отбор визуально здоровых кустов.
2. Заготовка черенков с визуально здоровых кустов.
3. Оздоровление при введении сорта в культуру методом апикальных меристем при относительном размере апекса 0,1-0,2 мм.
4. Регенерация растений из меристем (собственно микроразмножение, ризогенез, микрочеренкование).
5. Тестирование полученных растений на наличие вирусов:
  - а) методом травянистых индикаторов;
  - б) элиза-тест или метод ПЦР;
  - в) методом зеленой прививки на сортах-индикаторах.
6. Микроразмножение оздоровленных растений в культуре *in vitro*.
7. Адаптация растений к нестерильным условиям.
8. Закладка маточника базового посадочного материала в стационарной, пленочной теплице или в открытом грунте.
9. Содержание базовых клонов в условиях, исключающих их повторное заражение пылью, воздушными или почвообразующими векторами вирусов с регулярным ретестированием.

10. Вегетативное размножение базовых клонов и культивирование маточников в условиях защиты от вторичного заражения с соответствующим ретестированием.

11. Заготовка черенков на базисном маточнике и закладка маточника сертифицированного посадочного материала и плодоносящих насаждений.

Благодаря этому переход на закладку промышленных насаждений сертифицированным посадочным материалом обеспечивает повышение продуктивности виноградников и продление их продуктивной эксплуатации.

Для производства высококачественного посадочного материала винограда нами предложена биотехнологическая система освобождения растений винограда от комплекса вирусов и производства безвирусного посадочного материала. Система включает в себя следующие блоки методов: биологическое тестирование растений на вирусы, термо- или хемотерапия в условиях *in vitro*, культивирование органов и тканей и получение регенерантов, адаптация пробирочных растений *in vivo*, ретестирование, сертификация.

Оздоровление растений осуществляется при помощи культуры апикальных меристем при относительном размере эксплантов 0,1-0,2 мм, так как установлено, что экспланты малых размеров являются лучшими для элиминации вирусов. Для повышения низкой регенерационной способности таких эксплантов в лаборатории биотехнологии разработана оригинальная технология микрклонального размножения, защищенная 13 патентами. Она состоит из следующих последовательных этапов: изолирование эксплантов (центральные почки глазков) и получение асептической культуры *in vitro*, выделение верхушечной меристемы, индукция адвентивного побегообразования, укоренение побегов, получение пробирочных растений и их размножение, высадка растений-регенератов в почвенный субстрат.

Ключевым моментом технологии является регенерация целого нормального жизнеспособного растения. Успех культивирования *in vitro* и получение нормальных растений непосредственно связаны с оптимизацией условий на каждом этапе технологии. Как правило, даже небольшие отклонения от оптимума приводят к резкому снижению скорости роста и размножения, а также к ухудшению физиологического состояния регенератов.

Для обеспечения развития виноградарства и виноделия в Российской Федерации особое внимание необходимо обратить на качественные характеристики посадочного материала и фитосанитарный контроль, *проведение сертификации маточников подвоев и привоев*. Необходимо разработать высокоэффективные технологии производства посадочного материала винограда стандартных, перспективных, новых высокоценных и дефицитных сортов высших категорий качества.

#### **Технологическая линия для производства оздоровленных саженцев клонального микроразмножения**

Все методы асептического получения исходных эксплантов и дальнейших манипуляций с ними необходимо проводить в условиях, обеспечивающих стерильность.

Необходимо предусмотреть хорошую увязку всех помещений, входящих в технологическую цепочку: мытьё и сушка посуды → приготовление среды → автоклавирование и стерилизация материалов сухим жаром → пересадка растительного материала → выращивание культур.

На основании анализа литературных данных и проведенной НИР во ВНИИВиВ рекомендуется следующая организация лаборатории:

- 1) помещение для хранения компонентов питательных сред, химической посуды, оборудованное бытовыми холодильниками, лабораторными столами и шкафами:

- 2) помещение для приготовления дистиллированной и бидистиллированной воды, оборудованное подводом холодной воды, силовой линией 220/230 в, дистилляторами и бидистилляторами, желательна установка для приготовления сверхчистой и общелабораторной воды;
- 3) моечная комната, оборудованная глубокими кислотоупорными раковинами для мытья посуды, моечными машинами, сушильными шкафами, вытяжками;
- 4) помещение для приготовления питательных сред, оборудованное шкафами для чистой посуды и реактивов, столами с большой рабочей поверхностью, холодильниками для хранения маточных растворов, техническими и аналитическими весами, рН-метрами, водяными банями;
- 5) стерилизацию питательных сред и материалов проводят в специальной комнате, оснащенной автоклавами и сухожаровыми шкафами;
- 6) работы, связанные с асептическим переносом растительного материала, проводятся в стерильных боксах, в которых устанавливаются бактерицидные лампы, ламинарные боксы – установки обеспыливания с горизонтальным или вертикальным потоком воздуха;
- 7) культуральная комната, для выращивания растений *in vitro*, площадью до 30 м<sup>2</sup>, в которой устанавливаются стеллажи из металлического уголка с осветительными лампами. Помещение должно быть оборудовано приборами, обеспечивающими следующий режим: освещение 3-5 тыс. люкс на протяжении 16 часов, температура – 25-27°С, влажность – 70-80%.
- 8) стеллажи ускоренного выращивания растений (СУВРы) для адаптации оздоровленных мериклонов к нестерильным условиям;
- 9) пленочные теплицы (временно защищенный грунт) площадь 0,5 га.

Кроме этого, необходимо иметь достаточный запас химической посуды для приготовления и хранения питательных сред, для клонального микроразмножения, а также необходимые реактивы, материалы и инвентарь.

### Заключение

1. Биотехнология является междисциплинарной областью знаний, базирующейся на микробиологии, биохимии, молекулярной биологии, биоорганической химии, биофизике, вирусологии, иммунологии, генетике, инженерных науках и электронике. Многие исследователи определяют биотехнологию как область знаний, на основе которой посредством управляемого культивирования организмов и/или их фрагментов (тканей, клеток) получают полезные для человека продукты: пищу, корма, медицинские препараты, разнообразное сырье, средства защиты растений и животных, а также утилизируют различные органические отходы.

2. Использование принципиально нового объекта – изолированной культуры клеток или тканей (выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях) раскрыло большие возможности в решении теоретических и практических задач. Сегодня можно с уверенностью заключить, что методы культуры органов, тканей и клеток *in vitro* занимают прочное место в арсенале средств, определяющих значительный прогресс в селекции винограда и в деле производства посадочного материала этой древнейшей и широко распространенной культуры.

3. Клональное микроразмножение позволяет полнее всего реализовать потенциал растительного организма к размножению. Это направление является чрезвычайно перспективным, так как по сравнению с традиционными методами размножения обладает рядом преимуществ. **Основное**

**преимущество клонального микроразмножения** – это получение генетически однородного, **безвирусного посадочного материала**.

4. Вирусные инфекции наносят постоянный экономический ущерб сельскохозяйственным культурам, и, в том числе, виноградарству. Вирусы, размножаясь в растительных клетках, вызывают нарушения в обмене веществ: в листьях снижается содержание хлорофилла, происходит нарушение водного режима, изменения в белковом обмене и минеральном питании больных растений. Нарушая ход физиологических процессов, вирусы, в конечном счете, оказывают влияние на количество и качество продукции. Зараженные растения в большинстве случаев снижают количество и качество урожая, страдают от неблагоприятных условий внешней среды. Ослабленные кусты нередко преждевременно усыхают, вызывая раннюю изреженность виноградников.

5. В настоящее время проблема борьбы с вирусными болезнями, а также поддержания и хранения коллекционного генофонда, решается с помощью культуры апикальных меристем и клонального микроразмножения *in vitro*. С размноженных *in vitro* маточных растений получают в два раза больше саженцев, причем их качество выше, чем у растений, размноженных традиционными способами, и, что немаловажно, такая тенденция сохраняется в последующие годы. Положительные характеристики безвирусного материала, полученного методом культуры меристем, позволяют рекомендовать этот метод для промышленного питомниководства, в частности, для создания маточных насаждений.

6. Сертификационная схема представляет собой систему производства посадочного материала, получаемого из отобранных клонов через несколько стадий размножения, в условиях, обеспечивающих соблюдение санитарных стандартов, для посадки, с целью закладки маточников и промышленных виноградников.

7. Для производства высококачественного посадочного материала винограда предложена биотехнологическая система освобождения растений винограда от комплекса вирусов и производства безвирусного посадочного материала. Система включает в себя следующие блоки методов: биологическое тестирование растений на вирусы, термо- или хемотерапия в условиях *in vitro*, культивирование органов и тканей и получение регенерантов, адаптация пробирочных растений *in vivo*, ретестирование, сертификация.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Абрашева П. Влияние вируса на листовое завивание верхушечной, гроздевой и виноной на сорт Каберне-Совиньон // П. Абрашева, И. Чалков // Градинар и лозар наука. — 1974. - №7.
2. Абрашева П. Краткие сведения о физиологическом воздействии вирусных болезней на рост и плодоношение виноградной лозы / П. Абрашева // Физиология винограда и основы его возделывания. - Т. 2. - София. 1983. - С. 227-236.
3. Абрашева П. Мозаика по нерватурапа на листата на лозата в България / П. Абрашева // Градинска и лозарска наука. — 1978. - Vol. XVI, № 4. — С. 87 - 90.
4. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. — М., 1999.
5. Вердеревская Т. Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т. Д. Вердеревская, В. Г. Маринеску. — Кишинев: Штиинца, 1985. — 311 с.
6. Винклер Г. Н. Применение черенкования при выращивании безвирусных растений картофеля методом культуры меристем / Г. Н. Винклер, Р. Г. Бутенко // Физиология растений. — 1970. т. 17. — Вып. 4. — С. 851-853.
7. Голодрига П. Я. Методические рекомендации по клональному микроразмножению винограда / П. Я. Голодрига, В. А. Зленко, Л. А. Чекмарев [и др.] — Ялта, 1986. — 26 с.
8. Голодрига П. Я. Технология ускоренного размножения сортов винограда с применением культуры изолированной ткани / П. Я. Голодрига [и др.] // Сельскохозяйственная биология. — 1985. — № 3.
9. Крылова Н. В. Проникают ли вирусы в апикальную меристему растений? / Н. В. Крылова, В. И. Степаненко // Вирусные болезни с.-х. Дальнего Востока. — Владивосток, 1971. — Вып. 3. — С. 225-226.
10. Литвак А. И. Культура клеток, тканей и органов винограда *in vitro* / А. И. Литвак, А. П. Кузьменко // Селекция устойчивых сортов винограда. — Кишинев, 1982. — С. 116-139.
11. Маленин И. Производства на свободен от вирус, от бактериален рак и еакариоза лозов посадъин материал в България / И. Маленин, П. Абрашева, Е. Тодорова // Лозарство и винарство. — 1988. - №6. — С. 9-12.
12. Милкус Б. Влияние вируса инфекционного хлороза винограда на белковый обмен растений / Б. Милкус, Н. Еремеева // Физиология и биохимия культурных растений. — 1975. — №5.

13. Милкус Б. Росподіл фото синтетичних асимілятив у винограду, ураженого вірусом інфекційного хлорозу / Б. Милкус. С. Стыцько // Виноградарство і виноробство. — 1972. — №13.
14. Мулюкина Н. А. Вирусные болезни и бактериальный рак винограда / Н. А. Мулюкина. — Одесса, ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова», 2005. — 148 с.
15. Муромцев Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. И. Тихоненко. — М. — 1990. — С. 154-228.
16. Панделиев С. Обезвирусен посадъчен материал – по метода на тканните културн / С. Панделиев, С. Крстанова, В. Ковачев и др. // Лозарство и винарство. — 1988. — №6. — С. 4- 7.
17. Рубин Б. Физиология на растенията / Б. Рубин / Изд.: Земиздат, София, 1968. — 542 с.
18. Самусь В.А. Предварительные результаты инициации культуры *in vitro* районированных подвоев яблони / В. А. Самусь, С. Э. Семенов. А. П. Коноплева // Плодоводство, Самохваловичи. — 2002. — Т. 14. — С. 22-28.
19. Хьюитт Ж. О. Вирусные и вирусоподобные болезни винограда / Ж. О. Хьюитт // Вирусные болезни ягодных культур и винограда. — М. — 1975. — С. 264-266.
20. Шевелуха В. С. Проблемы, приоритеты и масштабы сельскохозяйственной биотехнологии в XXI веке / В. С. Шевелуха // Сельскохозяйственная биотехнология. Том 1. - М. — С. 3-14.
21. Adwinckle (H.S). Culture of grape cultivars from apical meristems / H. S. Adwinckle et T. Buturas // - 1980. — Prac.7. - Conf. I. C. September, 8-12. Niagara Galls (Canada). — P. 339-341.
22. Altmayer B. The use of *in vitro* culture of grape vines to eliminate pathogens (different viruses, *Agrobacterium tumefaciens*) / B. Altmayer // *Vitis*. — 1990, Special Issue. — P. 463.
23. Barlass M. Clonal propagation through tissue culture / M. Barlass and K. G. M. Skene // *Austral Grapegrower and Winemaker*. —1979. — Vol/16/191. — P. 12 – 13.
24. Barlass M. Micropropagation of temperate fruits- application and limitation / M. Barlass // *Acta Horticulturae*. — 1989. - Vol. 240. — P. 373-379.
25. Barlass M. Tissue culture and disease control / M. Barlass, K. G. M. Skene // *Lee Proceeding of the 6 Australian Wine Industry Technical Conference*. — 1986. — P. 14.
26. Bini G. Prove di coltura *in vitro* di meristem apicalidi *Vitis vinifera* / G. Bini // *I. R. W. Ortoflorofruttic Hal.* — 1976-60. — P. 285-295.
27. Cook Y. The effect of virus disease leaf roll on the mineral composition of grape tissue and a comparison of leaf roll and potassium deficiency symptoms / Y. Cook, Goheen // *American Institute of Biological Sciences*. - 1961. - № 1.
28. Corte G. Importance la culture de meristems pour la multiplication accdree de clones de vigne exempts de virus / G. Corte, de A Mendonca // *Bulletin de l'O. J.V.* —1985. — № 58, 650- 651. — P. 396 – 402.
29. Duran-Vila N. Production of viroid-free by shoot tip culture / N. Duran-Vila, I. Juares, M. Arrequi // *American Journal of Enology and Viticulture*. — 1988. — Vol. 39. — P. 254-261.
30. Fanizza G. The response of range of genotypes of *Vitis vinifera* no sequential shoot tip cultures at temperatures / G. Fanizza, K. Ricciardi // *Euphytica*. —1988. — № 39/1. — P. 19-23.
31. Galsy (Rose) Culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris* / (Rose) Galsy // *Acad. Sc. Paris, Serle D.*, 1972. — 274. — P. 210-213.

32. Goheen A. C. / Association of Riskettsialike organism with Pierces disease of grapevines and alfaffad work / A. C. Goheen, G. Nyland, K. S. Lowe // *Phytopath.* — 1973. — Vol. 633. — P. 341-345.
33. Jako N. Elimination of lafrool – disease at Pinot noir and Merlot using apex cultures cannaissance / N. Jako // *De la Vigne et du Vin.* — 1986. — № 20. — P. 76- 86.
34. Kuzmanovic Slobadan. Problem virosa u vinogradarstvu / Slobadan Kuzmanovic, Mira Gavran // *Jugosl. Vinograd. I vinor.* — 1989, № 3-4. — P. 29-31.
35. Martin C. Vignnne settechniques de cultures ‘in vitro’/ Quelque resultats dune collabaration’ entre recherché publiquestn enterfrisprivel / C. Martin. et. al // *Bulletin de L’O.J.V.* - 1987. - 675-676. — P. 447-458.
36. Micropropagation of the Grapevine: Results of. 10 Years of Experiments in the Champagne vineyard and Results of the First Vinifications / A. Deloire, M. Charpentier, G. Berlioset et. al // *Am. J. Of Enologe and Viticulutre.* — 1995. —Vol. 46/4. — P. 571-578.
37. Monette P. L. Use of grapevine shoot tip cultures for detection offanleak virus by enzyme – linked, immunosorbent – assay / P. L. Monette // *Canadion Journal of Plant Science.* — 1985, № 65. — P. 977 – 980.
38. Morel G. Guirison de Dahlaias atteints d’une maladie a virus / G. Morel, C. Martin // *Acad. Sci.* - 1952. - 235/21.
39. Sakurai T. Cultural characteristics of virus free grapevinis, growth characteristics and fruit quality obull / T. Sakurai, K. Takei, A. Harada // *Jmanshi fruit three exner Stat, Manriki, Jamanashi-Shi.* — 1988. — № 7. — P. 9-19.
40. Staudt G. Elimination of virus diseas by in vitro culture / G. Standt and N. N. Kassemeyer // *Vitis.* — 1990, Special Issue.
41. Vanek G. Roz sirenje virus ovychchorob v cecoslovenskych vinohradoch / G. Vanek // *Vinograd.* — 1971. - № 10.

## REFERENCES

1. Butenko R. G. *Biologiya kletok vysshih rastenij in vitro i biotekhnologiya na ih osnove* / R. G. Butenko. – M., 1999.
2. Morel G. Guirison de Dahlaias atteints d.,une maladie a virus / G. Morel, C. Martin // *Acad. Sci.* - 1952. - 235/21.
3. Litvak A. I. Kul'tura kletok, tkanej i organov vinograda in vitro / A. I. Litvak, A. P. Kuz'menko // *Selekciya ustojchivyh sortov vinograda.* — Kishinev, 1982. — S. 116-139.
4. Golodriga P. Ya. Tekhnologiya uskorennoho razmnozheniya sortov vinograda s primeneniem kul'tury izolirovannoj tkani / P. Ya. Golodriga [i dr.] // *Sel'skohozyajstvennaya biologiya.* – 1985. – № 3.
5. Golodriga P. Ya. Metodicheskie rekomendacii po klonal'nomu mikrorazmnozheniyu vinograda / P. Ya. Golodriga, V. A. Zlenko, L. A. Chekmarev [i dr.] – Yalta, 1986. – 26 s.
6. Abrasheva P. Kratkie svedeniya o fiziologicheskom vozdejstvii virusnyh boleznej na rost i plodonoshenie vinogradnoj lozy / P. Abrasheva. // *Fiziologiya vinograda i osnovy ego vozdel'yvaniya.* - T. 2, Sofiya, 1983. - S. 227-236.
7. Rubin B. *Fiziologiya na rasteniyata* / B. Rubin / *Izd.: Zemizdat, Sofiya,* 1968. – 542 s.
8. Milkus B. Rospodil foto sintetichnyh asimilyativ u vinogradu, urazhenogo virusom infekcionnogo hlorozu / B. Milkus, S. Styc'ko // — *Vinogradarstvo i vinorobstvo.* — 1972. — №13.

9. Milkus B. Vliyanie virusa infekcionnogo hloroza vinograda na belkovyj obmen rastenij / B. Milkus, N. Ereemeeva // Fiziologiya i biohimiya kul'turnyh rastenij. — 1975. — №5.
10. Cook Y. The effect of virus disease leaf roll on the mineral composition of grape tissue and a comparison of leaf roll and potassium deficiency symptoms / Y. Cook, Goheen // American Institute of Biological Sciences. - 1961. - № 1.
11. Vanek G. Roz sirenie virus ovychchorob v cekoslovenskych vinohradoch/ G. Vanek // Vinograd. — 1971. - №10.
12. Abrasheva P. Vliyanie virusa na listnoto zavivane v"erhulozato, grozdeto i vinoto na sort Kaberne-Sovin'on // P. Abrasheva, I. CHalkov // Gradinar i lozar nauka. — 1974. - №7.
13. Verderevskaya T. D. Virusnye i mikoplazmennye zabolevaniya plodovyh kul'tur i vinograda / T. D. Verderevskaya, V. G. Marinesku. — Kishinev: Shtiinca, 1985. — 311 s.
14. Mulyukina N. A. Virusnye bolezni i bakterial'nyj rak vinograda / N. A. Mulyukina. — Odessa, NNC «IVIv im. V. E. Tairova», 2005. — 148 s.
15. Muromcev G. S. Osnovy sel'skohozyajstvennoj biotekhnologii / G. S. Muromcev, R. G. Butenko, T. I. Tihonenko. — M. — 1990. — S. 154-228.
16. Sheveluha V. S. Problemy, priority i masshtaby sel'skohozyaj-stvennoj biotekhnologii v XXI veke / V. S. Sheveluha. — Sel'skohozyajstvennaya biotekhnologiya. - Tom 1. - M. — S. 3-14.
17. Vinkler G. N. Primenenie cherenkovaniya pri vyrashchivanii bezvirusnyh rastenij kartofelya metodom kul'tury meristem / G. N. Vinkler, R. G. Butenko // Fiziologiya rastenij. — 1970. t. 17. — Vyp. 4. — S. 851-853.
18. Galsy (Rose). Culture in vitro des apex – de Vitis rupestris / (Rose) Galsy // Acad. Sc. Paris, Serle D., 1972. — 274. – P. 210-213.
19. Bini G. Prove di coltura in vitro di miristem iapicalidi vitis vinifera / G. Bini // I. R. W. Ortoflorofruttic Hal. — 1976-60. — P. 285-295.
20. Adwinckle (H. S). Culture of grape cultivars from apical meristems / H. S. Adwinckle et T. Buturas // - 1980. — Prac. 7 - Conf. I. C. September, 8-12. Niagara Galls (Canada). — R. 339-341.
21. Barlass. M. Clonal propogation through tissue culture / M. Barlass and K. G. M. Skene // Austral Grapegrower and Winemaker. — 1979. – Vol /16/ 191. — R. 12 – 13.
22. Monette P. L. Use of grapevine shoot tip cultures for detection offanleak virus by enzyme – linked, immunosorbent – assay / P. L. Monette // Canadion Journal of Plant Science. — 1985, № 65. — R. 977 – 980.
23. Corte G. Importance la culture de meristems pour la multiplication ac-cdree de clones de vigne exempts de virus / G. Corte, de A. Mendonca // Bulletin de I.O.I.V. — 1985. — № 58. — 650- 651. — R. 396 –402.
24. Jako N. Elimination of lafroot – disease at Pinot noir and Merlot using apex cultures cannaissance / N. Jako // De la Vigne et du Vin. — 1986. — № 20. —R. 76- 86.
25. Duran – Vila N. Production of viroid-free by shoot tip culture / N. Duran – Vila, I. Juares, M. Arrequi // American Journal of Enology and Viticulture. — 1988. — Vol. 39. — R. 254-261.
26. Pandeliev S. Obezvirusen posad"chen material – po metoda na tkannite kul'turn / S. Pandeliev, C. Krstanova, V. Kovachev i dr. // Lozarstvo i vinarstvo. — 1988. — №6. — S. 4- 7.
27. Abrasheva P. Mozaika po nervaturapa na listata na lozata v B"lgarii / P. Abrasheva // Gradinska i lozarska nauka. – 1978. - Vol. XYI, № 4. — S. 87 - 90.

28. Malenin I. Proizvodstva na svoboden ot virusi, ot bakterialen rak i eakarioza lozov posad" in material v B"lgariya / I. Malenin., P. Abrasheva Todorova // Lozarstvo i vinarstvo. — 1988. - №6. — S. 9-12.
29. Altmayer B. The use of in vitro culture of grape vines to eliminate pot-hogens (different viruses, *Agrobacterium tumefaciens*) / B. Altmayer // *Vitis*. — 1990, Special Issue. — R. 463.
30. Staudt G. Elimination of virus diseases by in vitro culture / G. Staudt and N. N. Kassemeyer // *Vitis*. — 1990, Special Issue.
31. Barlass M. Tissue culture and disease control / M. Barlass, K. G. M. Skene // Lee Proceeding of the 6 Australian Wine Industry Technical Conference. — 1986. — P. 14.
32. Kuzmanovic Slobadan. Problem virosa u vinogradarstvu / Slobadan Kuzmanovic, Mira Gavran // *Jugosl. Vinograd. I vinor.* — 1989, № 3-4. — P. 29-31.
33. Fanizza G. The response of range of genotypes of *Vitis vinifera* to sequential shoot tip cultures at temperatures / G. Fanizza, K. Ricciardi // *Euphytica*. — 1988. — № 39/1. — R. 19-23.
34. Muromcev G. Osnovy sel'skohozyajstvennoj biotekhnologii / G. Muromcev, R. G. Butenko i dr. // - M. — 1990. — S. 224-226.
35. Martin C. Vignne settechniques de cultures "in vitro" / 'Quelque resultats d'une collaboration' entre recherche publique et enterfriseur / C. Martin. et. al // *Bulletin de L'O.I.V.* - 1987. - 675-676. — R. 447-458.
36. Sakurai T. Cultural characteristics of virus free grapevines, growth characteristics and fruit quality / T. Sakurai, K. Takei, A. Harada // *Jmanshi fruit three exner Stat, Manriki, Jamanashi-Shi.* — 1988. — № 7. — R. 9-19.
37. Micropropagation of the Grapevine: Results of 10 Years of Experiments in the Champagne vineyard and Results of the First Vinifications / A. Deloire, M. Charpentier, G. Berlioset et. al // *Am. J. Of Enologie and Viticulutre.* — 1995.—Vol. 46/4. — R. 571-578.
38. Barlass M. Micropropagation of temperate fruits - application and limitation / M. Barlass // *Akta Horticulturae.* — 1989. - Vol. 240. — R. 373-379.
39. Samus' V. A. Predvaritel'nye rezul'taty iniciacii kul'tury in vitro rajonirovannyh podvoev yabloni / V. A. Samus', S. Eh. Semenas. A. P. Konopleva // *Plodovodstvo, Samohvalovichi.* — 2002. — T. 14. — S. 22-28.
40. H'yuit Zh. O. Virusnye i virusopodobnye bolezni vinograda / Zh. O. H'yuit // *Virusnye bolezni yagodnyh kul'tur i vinograda.* — M. — 1975. — S. 264-266.
41. Krylova N. V. Pronikayut li virusy v apikal'nuyu meristemu rastenij? / N. V. Krylova, V. I. Stepanenko // *Virusnye bolezni s.-h. Dal'nego Vostoka.* — Vladivostok, 1971. — Vyp. 3. — S. 225-226.