

С.В. Кушнарченко^{1*}, У.А. Манапканова^{1,2}, Н.К. Рымханова¹, Т.Т. Турдиев¹,
Б.А. Жумабаева², К.П. Аубакирова³, Н.Н. Галиакпаров³

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан;

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан;

³Институт молекулярной биологии и биохимии имени М.А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: svetlana_bio@mail.ru

Разработка *in vitro* технологии для элиминации вируса кустистой карликовости малины

Вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*) (RBDV) — один из наиболее распространенных и вредоносных патогенов малины, значительно снижающий урожайность этой культуры и качество ягодной продукции. Проведено сравнение эффективности различных способов оздоровления растений малины сорта «Малиновая гряда» от вируса RBDV в условиях *in vitro*. Для элиминации вируса RBDV были испытаны термотерапия, химиотерапия и криотерапия, а также сочетание этих методов. Термотерапию асептических растений проводили в термокамере при переменных температурах (16 ч, 38°C, освещенность 25 мкмол•м⁻²•с⁻¹; 8 ч, 24–26°C, темнота) в течение двух недель. Химиотерапия заключалась в культивировании растений *in vitro* в течение 4 недель на среде Мурашиге–Скуга с добавлением 30 мг/л противовирусного препарата рибавирина. Для криотерапии апикальных меристем использовали метод PVS2-витрификации. Тестирование растений *in vitro* на наличие вирусов проводили методом мультиплекс ТаqManреал-тайм ПЦР. Установлено, что проведенные по отдельности термотерапия и химиотерапия, а также сочетание этих обработок с криотерапией не приводили к элиминации вируса RBDV. Только в случае применения химиотерапии в сочетании с термотерапией у 37,5 % растений *in vitro* вирус не обнаруживался. Наиболее высокий выход освобожденных от вируса RBDV растений был получен при использовании комбинированного способа: химиотерапия + термотерапия + криотерапия, при этом у 66,7 % растений сорта «Малиновая гряда» подтвердилась элиминация от вируса RBDV.

Ключевые слова: *Rubus*, *Raspberry bushy dwarf virus*, химиотерапия, термотерапия, криотерапия, рибавирин, растения *in vitro*, вирусы.

Введение

Ягодководство в настоящее время представляет собой одну из наиболее быстро развивающихся отраслей сельскохозяйственного производства. Лимитирующим фактором развития этой отрасли в Казахстане является нехватка качественного посадочного материала, который завозится из-за рубежа, в основном из стран Европейского союза, России и Китая.

Малина — одна из наиболее популярных ягодных культур в странах умеренного климата, в том числе и в Казахстане. Согласно данным Комитета по статистике РК, в 2019 году малина в Казахстане выращивалась на площади 1121,2 га, в том числе в крестьянских и фермерских хозяйствах — 48,4 га; в сельскохозяйственных предприятиях — 40,2; в хозяйствах населения — 1032,6 га. Известно, что саженцы ягодных культур, размножаемые вегетативно, поражаются различными инфекциями, в том числе такими опасными внутриклеточными патогенами, как вирусы, что отрицательно сказывается на урожайности и качестве ягодной продукции. Для малины наиболее вредоносным считается переносимый с пыльцой вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus*) (RBDV), приводящий к формированию рассыпчатых ягод [1]. Этот патоген широко распространен во многих областях возделывания малины [2]. Так, было выявлено, что в Центральном регионе России от 27 до 46 % растений малины поражены вирусом RBDV, что приводит к значительному снижению продуктивности у различных сортов на 21–71 % [3].

Оздоровленный посадочный материал является одним из значимых факторов получения высокого урожая ягодных культур. Традиционно для оздоровления растений от вирусов применяется культура верхушечных (апикальных) меристем [4]. Апикальные меристемы размером 0,2–0,3 мм, свободные от вирусных частиц, вычленивают из растений *in vitro* и регенерируют на питательной среде в безвирусные растеньица. В связи с трудностью механического изолирования и низкой регенерационной способностью меристем такого размера часто этот метод сочетают с термо- и химиотерапией.

Как было показано в публикациях последних лет, криотерапия зарекомендовала себя в качестве нового эффективного биотехнологического метода оздоровления растительного материала от вирусных инфекций [5–7]. Метод криотерапии основан на использовании криоконсервации апикальных меристем. Протоколы криоконсервации разработаны к настоящему времени для большого числа видов растений, в том числе и для ягодных культур. В процессе криотерапии апикальные меристемы, изолированные из растений *in vitro*, погружают в жидкий азот (–196°C). Под действием сверхнизкой температуры инфицированные клетки (обычно это клетки вакуолизованные и дифференцированные) погибают, а из выживших свободных от патогенов меристематических клеток регенерируют оздоровленные растеньица. К настоящему времени продемонстрирована эффективность криотерапии для многих видов растений и различных вирусов: яблони (вирусы: хлоротическая пятнистость листьев яблони (*Apple chlorotic leaf spot virus*), вирус растрескивания ствола (*Apple stem pitting virus*) и вирус бороздчатости древесины (*Apple stem grooving virus*) [6, 8]; винограда (вирусы скручивания листьев винограда) [9]; картофеля (вирус скручивания листьев картофеля (*Potato leaf roll virus*), вирус картофеля Y (*Potato virus Y*), вирус картофеля M (*Potato virus M*) [10, 11].

Однако для некоторых видов растений невозможно добиться освобождения от вирусов с использованием только одного метода. Многие исследователи, занимающиеся вопросами оздоровления малины, отмечают, что культура апикальных меристем, традиционно используемая для этих целей, не приводит к элиминации наиболее вредоносного вируса RBDV [2, 9, 12–14]. Как полагают, это связано с тем, что вирус RBDV локализуется не только в стеблях и листьях малины, но также поражает большую часть меристематических тканей, что было продемонстрировано с помощью иммуногистологического исследования [2]. Также не было достигнуто положительных результатов в оздоровлении малины методом химиотерапии с применением противовирусного препарата рибавирина, а также комбинирование метода апикальных меристем с химиотерапией [15, 16]. RBDV относится к термолabile вирусам, поэтому термотерапия инфицированных растений могла бы дать положительный эффект. Однако сообщается, что термотерапия (38°C/26°C) в течение 3–5 недель в сочетании с культурой апикальных меристем также были безуспешными для элиминации RBDV [2]. После многих попыток найти эффективный способ освобождения от вирусов малины, исследователи сошлись во мнении, что для таких сложных рекальцитратных культур, как малина, наиболее действенным способом оздоровления может стать криотерапия в сочетании с термо- и/или химиотерапией [2, 7].

Целью настоящего исследования являлось сравнение эффективности различных методов оздоровления (химиотерапии, термотерапии и криотерапии), а также их сочетания, для элиминации вируса RBDV у растений малины *in vitro*.

Материалы и методы исследований

Объекты исследования и условия культивирования растений in vitro. Объектами исследования являлись растения *in vitro* трех сортов малины: *Геркулес*, *Солоха* и *Малиновая гряда*, размноженные на среде Мурасиге–Скуга (МС) [12, 13], с добавлением фитогормонов: 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 30 г/л сахарозы, рН 5,8. Асептические растения культивировали в светокультуральной комнате при температуре 24°C, освещенности 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16-часовом фотопериоде с пассированием на свежие питательные среды каждые 4 недели.

Элиминация вируса RBDV из растений малины in vitro. Для элиминации вируса RBDV из растений *in vitro* были использованы следующие обработки:

- I способ — термотерапия растений *in vitro*;
- II — термотерапия растений *in vitro* + криотерапия апикальных меристем;
- III — химиотерапия растений *in vitro*;
- IV — химиотерапия растений *in vitro* + криотерапия апикальных меристем;
- V — химиотерапия + термотерапия растений *in vitro*;
- VI способ — химиотерапия + термотерапия + криотерапия апикальных меристем.

Химиотерапия растений in vitro. Химиотерапия заключалась в культивировании растений *in vitro* в течение 4-недельной среды МС с добавлением различных концентраций рибавирина (0, 20, 30, 40 мг/л). При определении влияния рибавирина учитывали состояние и количество побегов. Коэффициент размножения высчитывали по формуле

$$Kp = a/b \cdot c,$$

где *a* — количество вновь образовавшихся побегов; *b* — количество побегов высаженных для размножения; *c* — количество пассажей.

Термотерапия растений in vitro. Термотерапию асептических растений проводили при переменных температурах (16 ч, 38°C, при освещенности 25 мкмол•м⁻²•с⁻¹; 8 ч, 24–26°C, в темноте) в течение двух недель.

Криотерапия апикальных меристем. Для криотерапии апикальных меристем использовали метод PVS2-витрификации, разработанный ранее для криоконсервации малины, с небольшими модификациями [13]. Апикальные меристемы размером 0,8–1,0 мм выделяли из асептических растений *in vitro*, прошедших закаливание в климакамере при переменных температурах (16 ч –1°C, освещенность 10 мкмол•м⁻²•с⁻¹; 8 ч, темнота, 22°C) в течение 1 недели. Изолированные меристемы предварительно культивировали на среде МС с добавлением 0,3 М сахарозы в течение 2 суток в условиях закаливания, затем помещали в криопробирки с жидкой средой МС с 0,4 М сахарозой и 2 М глицерином, затем переносили в раствор криопротектора PVS2 (глицерин 30 %, этиленгликоль 15 %, диметилсульфоксид (ДМСО) 15%) на 80 мин на льду (0°C) и погружали в сосуд Дьюара с жидким азотом на 15–20 мин. Размораживание криопробирок с меристемами проводили в водяной бане при температуре 45°C в течение 1 мин, затем при 25°C, 1 мин. После промывания средой МС с 1,2 М сахарозой, меристемы переносили на среду МС для размножения, состав которой указан выше.

После каждой проведенной обработки (I–VI) растения *in vitro* были протестированы на присутствие вирусной инфекции.

Тестирование растений малины invitro на вирусы. Тестирование на вирусы проводили методом мультиплекс TaqMan реал-тайм ПЦР. Определяли четыре вируса: вирус кольцевой пятнистости малины (*Raspberry ringspot virus* (RRV)), вирус крапчатости листьев малины (*Raspberry leaf mottle virus* (RLMV)), вирус размытых пятен листьев малины (*Raspberry leaf blotch virus* (RLBV)) и вирус кустистой карликовости малины (*Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV)). Выделение тотальной РНК проводили с использованием модифицированного СТАВ метода (16): 50–100 мг листьев, отобранных из растений *in vitro*, гомогенизировали в 1 мл буфера (100 мМ Трис-НСl рН 8,0; 20 мМ ЭДТА рН 8,0; 1,4 М NaCl; 2% СТАВ; 2% PVP и 0,2% 2-меркаптоэтанола). Гомогенат инкубировали при 65°C в течение 30 мин и затем экстрагировали равным объемом хлороформа. К водной фазе добавляли 2 объема 96 % этанола. Смесь инкубировали при 20°C 15–20 мин, центрифугировали 15 мин при 13000 g. Осадок РНК промывали 70 % этанолом и растворяли в 70 мкл воды. Качество образцов проверяли по наличию 28S и 18S рибосомальных РНК с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

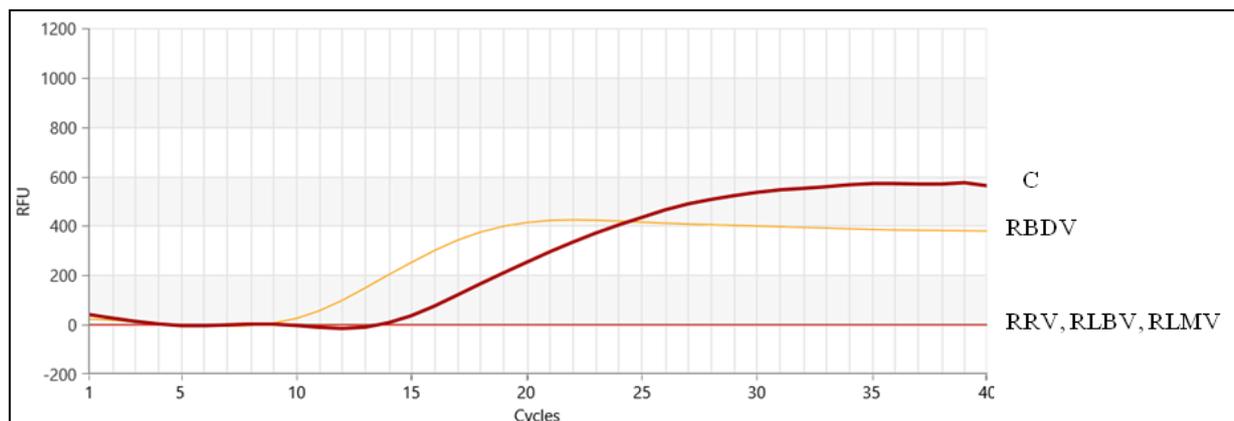
Реакция обратной транскрипции: 3 мкл тотальной РНК денатурировали при 72°C в течение 10 мин в присутствии 1 мкл 10 мМ обратного праймера для каждого вируса и внутреннего контроля в общем объеме 14,5 мкл, с последующей инкубацией во льду в течение 5 мин. Затем к РНК добавляли 4,5 мкл 5х буфера обратной транскриптазы, 0,2 мМ дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и 200 ед. обратной транскриптазы М-MLV (QuantumScript). Реакционную смесь инкубировали в термоблоке при 42°C в течение 1 ч.

Мультиплекс Real-Time ПЦР проводили в объеме 25 мкл, содержащем 2,5 мкл 10X Таq буфера, 2,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дезоксирибонуклеотид трифосфатов, 0,2 мкМ обратного и прямого праймера для каждого вируса и внутреннего контроля, 0,2 мкМ ТаqMan зондов для каждого вируса и внутреннего контроля, 0,5 ед. Таq ДНК полимеразы и 2 мкл кДНК. Амплификацию проводили на ПЦР машине Gentier 96E по следующей программе: один цикл 94°C — 5 мин ; 40 циклов, состоящих из следующих ступеней: при 94°C — 30 с, отжиг при 55°C — 30 с и синтез при 72°C — 60 с; окончательная элонгация при 72°C в течение 10 мин. Считывание флуоресценции проводили после каждого цикла. Анализ результатов проводили на программном обеспечении ПЦР машины: Real-time PCR system version 1.

Эксперименты проводили в 3-х повторностях. Статистический анализ осуществляли по общепринятым методикам [17].

Результаты и их обсуждение

Растения *in vitro* трех сортов малины: *Геркулес*, *Малиновая гряда* и *Солоха* были протестированы на наличие четырех вирусов (RBDV, RLBV, RLMV и RRV), и было подтверждено присутствие вируса RBDV в растениях сорта *Малиновая гряда* (рис. 1). Значения порогового цикла (Ct) и стандартные кривые ПЦР в реальном времени были автоматически сгенерированы с помощью программного обеспечения Gentier Real-Time PCR System v1 (Xi'an TianLong Science and Technology Co., LTD). Пороговые циклы (Ct) для RBDV и внутреннего контроля составили 11 и 12, соответственно. За отрицательный результат принимались значения Ct свыше 35.

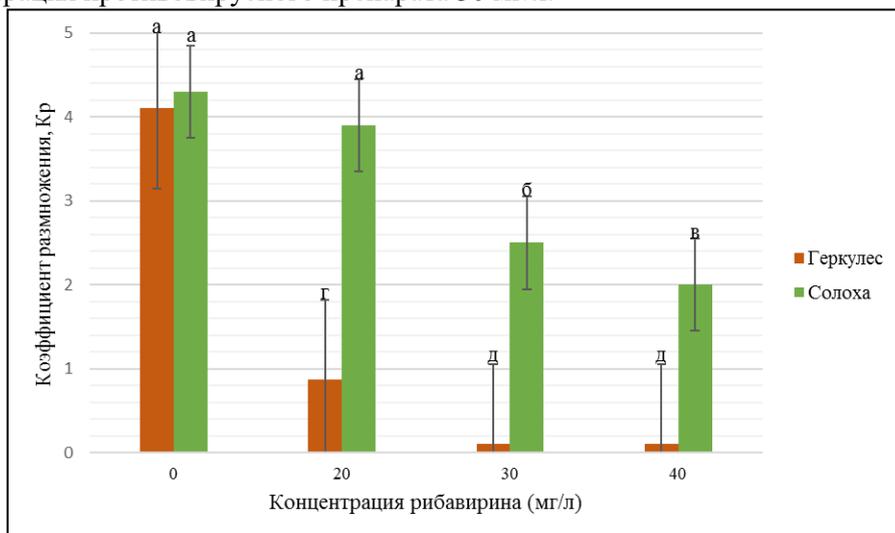


Примечание. Raspberry ring spot virus (RRV); Raspberry bushy dwarf virus (RBDV); Raspberry leaf blotch virus (RLBV); Raspberry leaf mottle virus (RLMV); Внутренний контроль (C).

Рисунок 1. Диагностика сорта *Малиновая гряда* (растение *in vitro*, не подвергавшееся обработкам) с использованием мультиплекс ТаqMan ПЦР в реальном времени

На двух безвирусных сортах малины (*Геркулес*, *Солоха*) было предварительно изучено влияние отдельно проведенных термотерапии и химиотерапии, а также их комбинаций с криотерапией на состояние растений и жизнеспособность апикальных меристем. В результате химиотерапии с добавлением различных концентраций рибавирина (0, 20, 30, 40 мг/л) в среду МС было показано, что препарат значительно ухудшал состояние растений *in vitro*, приводя к некрозу побегов, а также снижал коэффициент размножения растений малины. Сорт *Геркулес* гораздо сильнее подвергался ингибирующему действию рибавирина по сравнению с сортом *Солоха* (рис. 2, 3). Рибавирин в концентрации 40 мг/л практически полностью ингибировал размножение растений сорта *Геркулес*, и более, чем в 2 раза снижал коэффициент размножения растений сорта *Солоха* (рис. 2).

Рибавирин, добавленный в питательную среду, снижал также выживаемость и регенерацию апикальных меристем после криотерапии. Так, у сорта *Солоха* регенерация апикальных меристем в контроле после проведенной криотерапии составляла 75 %, а после двухнедельной химиотерапии достоверно снижалась до 62,5; 61,5 и 58,5 % в зависимости от концентрации рибавирина. У сорта *Геркулес* регенерация меристем в контроле составляла 40,7 %, тогда как после химиотерапии снижалось до 35,4 % и 33,3 % (рис. 4). Учитывая сильное ингибирующее действие рибавирина в концентрации 40 мг/л на состояние растений малины *in vitro*, их размножение, а также регенерацию апикальных меристем, в последующих экспериментах по оздоровлению растений сорта *Малиновая гряда* была использована концентрация противовирусного препарата 30 мг/л.



Примечание. Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при $P \leq 0,05$.

Рисунок 2. Влияние концентрации рибавирина в питательной среде Мурасиге–Скуга на коэффициент размножения растений *in vitro* двух сортов малины

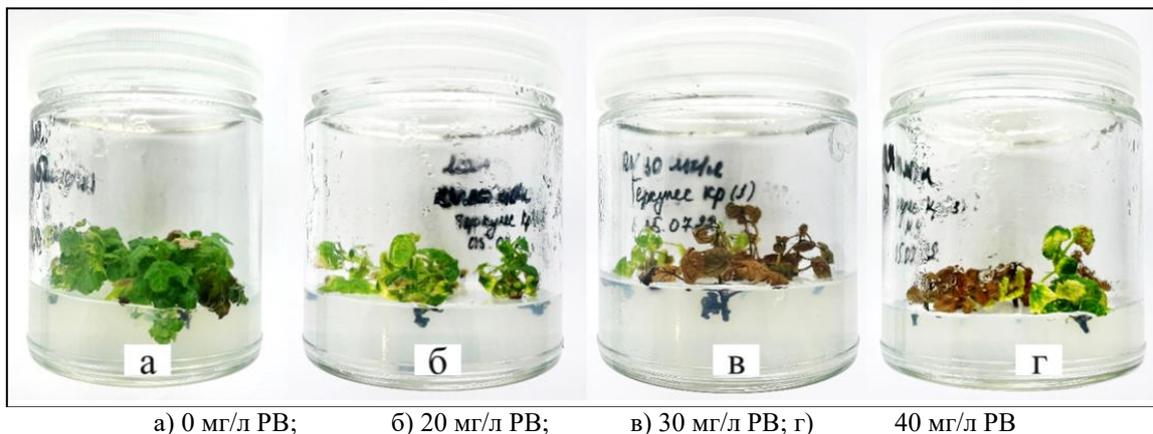


Рисунок 3. Влияние концентрации рибавирина (РВ) при химиотерапии на состояние растений сорта *Геркулес* при культивировании в течение 4 недель

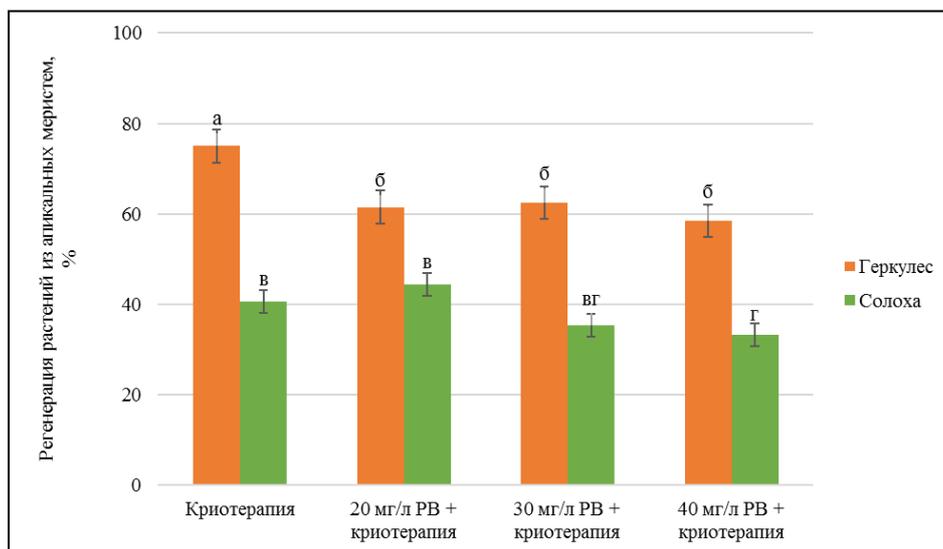
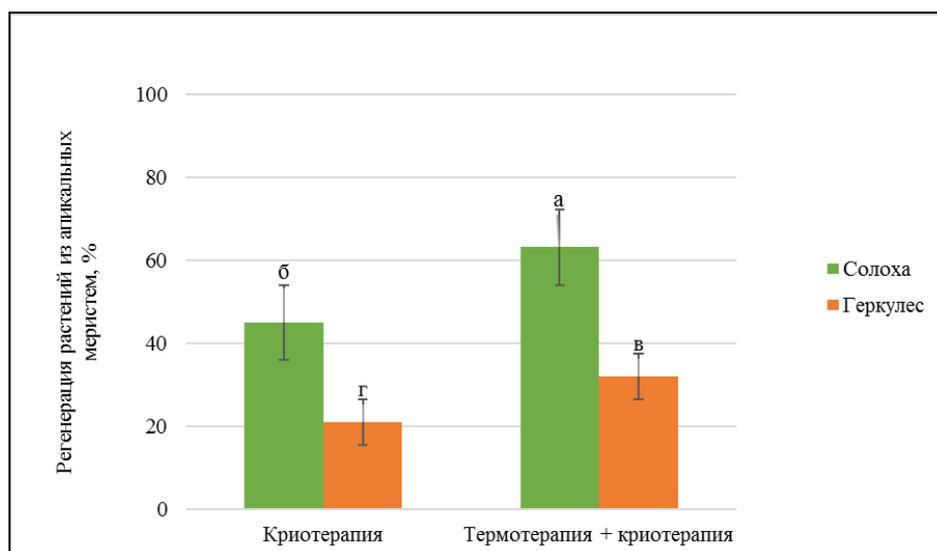


Рисунок 4. Влияние концентрации рибавирина (РВ) при химиотерапии на регенерацию растений из апикальных меристем малины после криотерапии

Примечание. Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при $P \leq 0,05$.

Было установлено, что, в отличие от химиотерапии, проведенная термотерапия растений *in vitro* положительно влияла на выживаемость апикальных меристем, регенерированных после криотерапии (рис. 5). У сорта *Солоха* регенерация растений достоверно возрастала с 45,0 % (криотерапия) до 63,2 % (термотерапия + криотерапия). У сорта *Геркулес* с 21,0 до 32,0 %, соответственно (рис. 5).



Примечание. Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при $P \leq 0,05$.

Рисунок 5. Влияние термотерапии растений *in vitro* на выживаемость апикальных меристем, регенерированных после криотерапии

В последующей серии экспериментов по оздоровлению растений *in vitro* малины сорта *Малиновая гряда* от вируса RBDV было испытано 6 различных способов обработки (см. табл.). После каждой обработки растения *in vitro* были протестированы на наличие вирусной инфекции.

Т а б л и ц а

Результаты использования различных обработок для элиминации вируса кустистой карликовости малины (RBDV) у сорта *Малиновая гряда*

Метод обработки	Кол-во меристем, шт.	Регенерация растений, шт./%	Процент оздоровленных от RBDV растений <i>in vitro</i>
I способ: термотерапия	9	3 / 33,3 ^б	0
II: термотерапия + криотерапия	11	2 / 18,2 ^г	0
III: химиотерапия	12	6 / 50,0 ^б	0
IV: химиотерапия + криотерапия	10	8 / 80,0 ^а	0
V: химиотерапия + термотерапия	12	8 / 66,7 ^{аб}	37,5 ^б
VI способ: химиотерапия + термотерапия + криотерапия	12	6 / 50,0 ^б	66,7 ^{аб}

Примечание. Режим термотерапии: Растения *in vitro* помещали в термокамеру на 2 недели при переменных температурах (16 ч при 38°C, освещенность 25 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$; 8 ч при 24°C в темноте). Режим химиотерапии: Растения *in vitro* культивировали на среде Мурашиге–Скуга с добавлением 30 мг/л рибавирина в течение 3 недель при температуре 24°C, освещенности 25 $\mu\text{мол}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, 16- часовом фотопериоде. Криотерапию проводили с использованием метода PVS2 витрификации. Различия между данными, обозначенными разными буквами, достоверны при $P \leq 0,05$.

В результате исследований было установлено, что проведенные по отдельности термотерапия (I способ) или химиотерапия (III способ) не приводили к элиминации вируса RBDV. Сочетание этих двух обработок с криотерапией (II способ и IV способы) также не давали положительных результатов. Только в случае обработки химиотерапией, комбинированной с термотерапией (V способ), у 37,5 % растений *in vitro* вирус не обнаруживался. Наиболее высокий выход освобожденных от вируса RBDV растений был получен при использовании комбинированной обработки: химиотерапия + термотерапия + криотерапия (VI способ), при этом у 66,7 % растений подтвердилась элиминация от вируса RBDV.

Полученные результаты согласуются с данными зарубежных исследователей [2, 7] о невозможности оздоровить растения малины каким-либо одним методом. В работе Matew et al. [7] двухнедельная химиотерапия на питательной среде с 30 мг/л рибавирина или термотерапия, проведенные по отдельности, так же, как и в настоящем исследовании, не приводили к положительному результату.

Наибольший процент безвирусных растений малины (78,9 %) новозеландскими исследователями также был получен с использованием комбинированной обработки (химиотерапия + термотерапия + криотерапия) [7].

Заключение

В результате проведенной работы было продемонстрировано, что с помощью сочетания трех методов: химиотерапии, термотерапии и криотерапии можно с высокой эффективностью оздоровить растения малины *in vitro* от вируса кустистой карликовости малины (RBDV). Впервые в Казахстане для получения безвирусного растительного материала малины разработан биотехнологический способ, который позволит не только провести оздоровление от фитопатогенов, но и надежно сохранить элитный посадочный материал в криогенном банке.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках Программно-целевого финансирования BR18574099.

Список литературы

- 1 Converse R.N. Virus disease of small fruits / R.N. Converse. — USDA ARS Agricultural Handbook, 1987. — No. 631. — 277 p.
- 2 Wang Q. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants / Q. Wang, W.J. Cuellar, M. Rajamaki, Y. Hirata, J.P.T. Valkonen // *Molecular Plant Pathology*. — 2008. — Vol. 9. — P. 237-250. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>
- 3 Тихонова К.О. Распространенность, вредоносность вирусных болезней и эффективные методы оздоровления малины: дис. ... канд. с.-хоз. наук / К.О. Тихонова. — М., 2016. — 128 с.
- 4 Faccioli G. Virus elimination by meristem tip culture and tip micro grafting / G. Faccioli, F. Marani // *Plant Virus Disease Control*. — St. Paul: APS Press, 1998. — P. 346-380.
- 5 Wang Q. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method / Q. Wang, J.P.T. Valkonen // *Trends in Plant Science*. — 2008. — Vol. 14 (3). — P. 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>
- 6 Bettoni J.C. Eradication of latent viruses from apple cultivar “Monalisa” shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy / J.C. Bettoni, J.A. Souza, G.M. Volk, M. Dalla Costa, F.N. da Silva, A.A. Kretschmar // *Scientia Horticulturae*. — 2019. — Vol. 250. — P. 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.033>
- 7 Mathew L. Efficiency of eradication of *Raspberry bushy dwarf virus* from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by *in vitro* chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations / L. Mathew, H. Tiffin, Z. Erridge, A. McLachlan, D. Hunter, R. Pathirana // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. — 2021. — Vol. 144. — P. 133-141. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01829-y>
- 8 Romadanova N.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.) / N.V. Romadanova, S.A. Mishustina, D.A. Gritsenko, M.Y. Omasheva, N.N. Galiakparov, B.M. Reed, S.V. Kushnarenko // *CryoLetters*. — 2016. — Vol. 37, No. 1. — P. 1-9.
- 9 Pathirana R. Removal of leafroll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification / R. Pathirana, A. Maclachan, D. Hedderley, A. Carra, F. Carimi, B. Panis // *Acta Horticulture*. — 2015. — Vol. 1083. — P. 491-498.
- 10 Wang Q. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY) / Q. Wang, Y. Liu, Y. Xie, M. You // *Potato Res.* — 2006. — Vol. 49. — P. 119–129. <https://doi.org/10.1007/s11540-006-9011-4>.
- 11 Kushnarenko S. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient *Potato virus M* and *Potato virus S* eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots / S. Kushnarenko, N. Romadanova, M. Aralbayeva, S. Zholamanova, A. Alexandrova, O. Karpova // *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. — 2017. — Vol. 53 (4). — P. 425-432. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9839-0>.
- 12 Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol Plantarum*. — 1962. — Vol. 15. — P. 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 13 Kovalchuk I.Y. Cryopreservation of raspberry cultivars: testing techniques for long-term storage of Kazakhstan’s plant germplasm / I.Y. Kovalchuk, T.T. Turdiev, S.V. Kushnarenko, I.R. Rakhimbaev, B.M. Reed // *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. — Vol. 4 (Special Issue 1). — 2010. — P. 1-4.
- 14 Aubakirova K. Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera* and *Armeniaca vulgaris* / K. Aubakirova, M. Omasheva, N. Ryabushkina, T. Tazhibayev, G. Kampitova, N. Galiakparov // *Genetics and Molecular Research*. — 2014. — Vol. 13 (1). — P. 1278-1287. <https://doi.org/10.4238/2014.February.27.13>.
- 15 Pūpola N. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy / N. Pūpola, L. Lepse, A. Kāle, I. Moročko-Bičevska // *Scientific Works of the Lithuanian University of Agriculture*. — 2009. — Vol. 28 (3). — P. 165-172.

16 Антонова О.Ю. Оздоровление малины от вируса кустистой карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* / О.Ю. Антонова, С.Е. Дунаева, Ю.В. Ухатова, Н.Ю. Камылина, Н.А. Долганова, О.В. Лисицина, Т.А. Гавриленко // Достижения науки и техники АПК. — 2015. — Т. 29 (7). — С. 61–64.

17 Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.

С.В. Кушнарченко, У.А. Манапканова, Н.К. Рымханова, Т.Т. Турдиев,
Б.А. Жумабаева, К.П. Аубакирова, Н.Н. Галиакпаров

Таңқурай бұталы ергежейлі вирусын жоюдың *in vitro* технологиясын әзірлеу

Таңқурай бұталы ергежейлі вирусы (*Raspberry bushy dwarf virus*) (RBDV) — ең көп таралған және зиянды, таңқурайды зақымдайтын қоздырғыштардың бірі, бұл вирустың түрі дақылдың өнімділігі мен жидек өнімдерінің сапасын айтарлықтай төмендетеді. Зерттеуде *in vitro* жағдайында таңқурайдың «Малиновая гряда» сортын RBDV вирусынан сауықтыру мақсатында әртүрлі әдістердің тиімділігі салыстырылды. RBDV вирусын жою үшін термотерапия, химиятерапия және криотерапия, сондай-ақ осы әдістердің қосындысы сынақтан өтті. Асептикалық өсімдіктердің термотерапиясы арнайы термокамерада ауыспалы температура жағдайында (16 сағат 38°C, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ жарықта; 8 сағат, 24–26°C, қараңғыда) екі апта аралығында жүргізілді. Химиятерапияда вирусқа қарсы рибавирин препаратының 30 мг/л концентрациясын Мурасиге-Скуг қоректік ортасына қосып, өсімдіктер 4 апта бойы *in vitro* өсірілді. Апикальды меристемалардың криотерапиясы PVS2-витрификация әдісімен жүргізілді. Вирустардың *in vitro* бар болуына өсімдіктерді тестілеу мультиплекс ТаqMan реал-тайм ПТР әдісімен жүргізілді. Жеке жүргізілген термотерапия және химиятерапия, сондай-ақ осы өңдеу әдістерін криотерапиямен біріктіру RBDV вирусын жоюға әкелмегені анықталды. Химиятерапияны термотерапиямен бірге қолданған жағдайда ғана өсімдіктердің 37,5%-да *in vitro* вирус табылған жоқ. RBDV вирусынан тазартылған өсімдіктердің ең жоғары өнімділігі біріктірілген әдісті қолдану арқылы алынды, яғни: химиотерапия + термотерапия + криотерапия, бұл ретте «Малиновая гряда» сорты өсімдіктерінің 66,7% RBDV вирусынан сауықтырылғаны расталды.

Кілт сөздер: *Rubus*, *Raspberry bushy dwarf virus*, химиятерапия, термотерапия, криотерапия, рибавирин, *in vitro* өсімдіктері, вирустар.

S.V. Kushnarenko, U.A. Manapkanova, N.K. Rymkhanova, T.T. Turdiyev,
B.A. Zhumabayeva, K.P. Aubakirova, N.N. Galiakparov

Development of *in vitro* technique for elimination of *Raspberry bushy dwarf virus*

Raspberry bushy dwarf virus (RBDV) is one of the most common and harmful raspberry pathogens, significantly reducing yield of the crop and quality of berries. The efficiency of various methods for RBDV eradication in Malinovaya Gryada variety *in vitro* plant lets was compared. Thermotherapy, chemotherapy and cryotherapy, as well as combinations of these techniques, have been tested to eliminate RBDV. Thermotherapy of aseptic plants was carried out in a growth chamber at alternating temperatures (16 h at 38°C, light intensity 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; 8 h at 24–26°C, darkness) for two weeks. Chemotherapy was carried out by *in vitro* plant culture for 4 weeks on Murashige-Skoog medium with 30 mg/L of ribavirin. For cryotherapy of shoot tips, the PVS2 vitrification technique was used. *In vitro* plants were tested for viruses by multiplex TaqMan real-time PCR. It was found that thermotherapy and chemotherapy alone, as well as the combination of these treatments with cryotherapy, did not result in RBDV elimination. Only when chemotherapy was used in combination with thermotherapy, RBDV was not detected in 37.5% of *in vitro* plants. The highest percentage of RBDV-free plants was obtained using the combined technique: chemotherapy + thermotherapy + cryotherapy, while RBDV elimination was confirmed in 66.7% plants.

Keywords: *Rubus*, *Raspberry bushy dwarf virus*, chemotherapy, thermotherapy, cryotherapy, ribavirin, *in vitro* plants, viruses.

References

- 1 Converse, R.N. (1987). Virus disease of small fruits. USDA ARS Agricultural Handbook, 631.
- 2 Wang, Q., Cuellar, W.J., Rajamaki, M., Hirata, Y. & Valkonen, J.P.T. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. *Molecular Plant Pathology*, 9, 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00456.x>

- 3 Tikhonova, K.O. (2016). Rasprostranennost, vredonosnost virusnykh boleznei i effektivnye metody ozdorovleniia maliny [The prevalence, harmfulness of viral diseases and efficient methods of raspberry recovery]. *Candidate's thesis*. Moscow [in Russian].
- 4 Faccioli, G. & Marani, F. (1998). Virus elimination by meristem tip culture and tip micro grafting. *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, MN, 346-380.
- 5 Wang, Q. & Valkonen, J.P.T. (2008). Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14(3), 119-122. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>
- 6 Bettoni, J.C., Souza, J.A., Volk, G.M., Dalla Costa, M., da Silva, F.N. & Kretschmar, A.A. (2019). Eradication of latent viruses from apple cultivar "Monalisa" shoot tips using droplet-vitrification cryotherapy. *Scientia Horticulturae*, 250, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.033>
- 7 Mathew, L., Tiffin, H., Erridge, Z., McLachlan, A., Hunter, D. & Pathirana, R. (2021). Efficiency of eradication of *Raspberry bushy dwarf virus* from infected raspberry (*Rubus idaeus*) by *in vitro* chemotherapy, thermotherapy and cryotherapy and their combinations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 144, 133-141. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01829-y>
- 8 Romadanova, N.V., Mishustina, S.A., Gritsenko, D.A., Omasheva, M.Y., Galiakparov, N.N., Reed, B.M. & Kushnarenko, S.V. (2016). Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus sp.*). *CryoLetters*, 37(1), 1-9.
- 9 Pathirana, R., Maclachlan, A., Hedderley, D., Carra A., Carimi F. & Panis B. (2015). Removal of leaf roll viruses from infected grapevine plants by droplet vitrification. *Acta Horticulture*, 1083, 491-498.
- 10 Wang, Q., Liu, Y., Xie, Y. & You, M. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leaf roll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY). *Potato Research*, 49, 119-129. <https://doi.org/10.1007/s11540-006-9011-4>
- 11 Kushnarenko, S., Romadanova, N., Aralbayeva, M., Zholamanova, S., Alexandrova, A. & Karpova, O. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient *Potato virus M* and *Potato virus S* eradication in potato (*Solanum tuberosum L.*) *in vitro* shoots. *In vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 53(4), 425-432. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9839-0>
- 12 Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum*, 15, 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- 13 Kovalchuk, I., Turdiev, T.T., Kushnarenko, S.V., Rakhimbaev, I.R. & Reed, B.M. (2010). Cryopreservation of raspberry cultivars: testing techniques for long-term storage of Kazakhstan's plant germplasm. *Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 4 (Special Issue 1), 1-4.
- 14 Aubakirova, K., Omasheva, M., Ryabushkina, N., Tazhibayev, T., Kampitova, G. & Galiakparov, N. (2014). Evaluation of five protocols for DNA extraction from leaves of *Malus sieversii*, *Vitis vinifera* and *Armeniaca vulgaris*. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 1278-1287. <https://doi.org/10.4238/2014.February.27.13>
- 15 Pūpola, N., Lepse, L., Kāle, A. & Moročko-Bičevska, I. (2009). Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy. *Scientific Works of the Lithuanian University of Agriculture*, 28(3), 165-172.
- 16 Antonova, O.Yu., Dunaeva, S.E., Ukhatova, Yu.V., Kamylnina, N. Yu., Dolganova, N.A., Lisitsina, O.V. & Gavrilenko, T.A. (2015). Ozdorovlenie maliny ot virusa kustistoi karlikovosti (RBDV) metodom kompleksnoi terapii v kulture *in vitro* [Recovery of raspberry from Bushy dwarf virus (RBDV) by the method of complex therapy in *in vitro* culture]. *Dostizheniia nauki i tekhniki APK - Achievements of science and technology of the agro-industrial complex*, 29(7), 61-64 [in Russian].
- 17 Lakin, G.F. (1990). *Biometriia* [Biometry]. Moscow: Vysshaia shkola [in Russian].