

УДК 634.1/.7;578.2:21;602.6:59;602.6:612;57.086.13;57.536.483;631.589.2;631.544
DOI: 10.36305/0513-1634-2022-144-105-113

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИИ ОЗДОРОВЛЕНИЯ ОТ ВИРУСОВ *IN VITRO* ПОБЕГОВ И ПОЛУЧЕНИЕ БЕЗВИРУСНЫХ САЖЕНЦЕВ ЯБЛОНИ

Наталья Владимировна Ромаданова^{1,2}, Арман Болатханулы Толеген^{1,2},
Светлана Вениаминовна Кушнарченко¹

¹РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК,
Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Тимирязева, 45

²Казахский Национальный Университет. им. аль-Фараби, Республика Казахстан,
Алматы, пр. аль-Фараби, 71
E-mail: nata_romadanova@mail.ru

Химиотерапия с противовирусным препаратом рибавирин была использована, как метод для оздоровления *in vitro* побегов яблони. Установлено, что для получения безвирусных *in vitro* растений оптимальная концентрация рибавирина в питательной среде для микроклонального размножения – 50 мг/л. Для освобождения от вирусов инфицированных растений со 100% результативностью требуется 3 пассажа по 45 дней *in vitro* побегов на питательную среду с противовирусным препаратом рибавирин. Для корнеобразования *in vitro* побегов яблони (50-90%) эффективна ½ концентрация питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,25 мг/л индолилмасляной кислоты, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. На первом этапе для адаптации растений яблони (85-90%) к почвенному субстрату после перевода из условий *in vitro* необходимо накрывать их пластиковыми колпаками для сохранения влаги. Требуется равномерное проветривание саженцев для предотвращения образования гнили и плесени.

Ключевые слова: яблоня; химиотерапия; *in vitro* побеги; рибавирин; безвирусные саженцы

Введение

На данный момент во многих странах обострена ситуация, связанная с поражением яблони различными инфекционными болезнями. В Казахстане в яблоневых садах отмечены бактериальные, грибные и вирусные заболевания. Среди вирусных болезней наиболее распространены – вирус бороздчатости древесины (*Apple stem grooving virus* (ASGV)), вирус растрескивания ствола (*Apple stem pitting virus* (ASPV)) и вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV)) [1]. Распространение вирусных заболеваний тормозит развитие питомниководства, призванного обеспечивать аграрный сектор элитными саженцами коммерчески ценных сортов яблони. Основным фактором распространения заболеваний является недостаточное производство качественного посадочного материала и малое взаимодействие фермеров с научными учреждениями.

Во многих странах мира недостатки традиционных приемов производства качественных саженцев обусловили необходимость разработки учеными биотехнологических методов оздоровления растений в культуре *in vitro* и массовое производство безвирусных саженцев [1-7].

Известны биотехнологические методы оздоровления растительного материала, пораженного вирусной инфекцией – это термотерапия, культура верхушечных меристем, химиотерапия, криотерапия и сочетание этих методов. Термотерапия проводится как для *in vivo*, так и *in vitro* растений. Оздоровление заключается в выдерживании растений при повышенных температурах. Обычно температура постепенно наращивается, с 24°C до 37°C, после чего растение выдерживают при 37°C в течение ограниченного количества времени. Данное температурное воздействие приводит к разрушению накопленных в клетках вирусных частиц и даже к полному освобождению растения от вирусов. Однако, чаще в тканях уменьшается концентрация

вирусных частиц, и только лишь отдельные части или органы растений освобождаются от вирусной инфекции, например, такие как апикальные меристемы [2-3].

Ряд ученых предлагают получать свободный от вирусов материал с помощью культуры верхушечных меристем. Предполагается, что физиологически апикальные меристемы препятствуют проникновению вирусов и затрудняют их размножение в образовательных клетках. Однако экспериментально доказано наличие остаточной инфекции в пораженных вирусами меристематических тканях [2].

Криотерапия также является одним из способов оздоровления от вирусов. Уникальность этого метода заключается в погружении на непродолжительное время (достаточно 20 мин) инфицированных меристематических тканей в жидкий азот (-196°C), что приводит к разрушению клеток, в которых обычно могут быть расположены вирусы. В результате после размораживания меристем можно получить высокий процент свободных от вирусов жизнеспособных растений, например, 40% для культуры яблони [1,3-5].

В дополнение к вышеописанным способам борьбы с вирусами научный интерес представляет метод химиотерапии, когда в питательные среды при микроклональном размножении растений добавляют различные противовирусные препараты. Наиболее результативные эксперименты получены при использовании препарата рибавирин – синтетический аналог гуанозина (1-бета-рибофуранозил-1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) [5-7].

У разных растений варьирует процент освобождения от вирусов, для некоторых применение только одного способа терапии недостаточно для освобождения от патогенов, поэтому для достижения эффективности результатов требуется комбинировать сочетание двух, а то и трех методов оздоровления [2-5].

Объекты и методы исследования

Для экспериментов была использована коллекция из 77 образцов яблони *in vitro*, полученная в РГП «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК (ИББР) в лаборатории криосохранения гермоплазмы в период 2002-2019 гг. [1, 8]. Для введения в культуру *in vitro* исходные образцы яблони были привезены из Иле-Алатауского Национального парка, Казахского научно-исследовательского института плодовоовощеводства, крестьянских хозяйств: «Лиза», «Суздалева» и ТОО «Интеграция-Тургень», в том числе районированные коммерчески ценные сорта (*Malus domestica* Borkh.), клоновые подвои и дикорастущие формы (*Malus sieversii* (Ledeb. M. Roem.) и (*Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne).

Для оздоровления с помощью химиотерапии использовали *in vitro* растения яблони, инфицированные вирусами сортов: 'Апорт Александр' (ACLSV + ArMV + ASPV), 'Голд Раш' (ACLSV + ASPV), 'Ред Фри' (ACLSV), 'Ренет Ландсбергский' (ACLSV + ASPV), 'Суйслеппер' (ACLSV + ASPV) и клоновый подвой 'Б 7-35' (ASGV). Побеги в культуре *in vitro* размножали на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС), содержащей 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7 с добавлением противовирусного препарата рибавирин в концентрации: 50, 75 и 100 мг/л [6,9-10]. Культивирование побегов *in vitro* осуществляли в светокультуральной комнате, температурный режим: $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$, освещенность $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16/8 часовой фотопериод. Длительность культивирования (1 пассажа) составила 45 дней, количество пассажей варьировало от 1 до 3.

Диагностику вирусных заболеваний *in vitro* побегов яблони после химиотерапии проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [1]. Для тестирования использовали листья *in vitro* растений, из которых

выделяли тотальные препараты РНК. Для вирусов яблони ACLSV, АрMV и ASPV проводили конструирование праймеров сопоставляя известные последовательности нуклеотидов различных изолятов исследуемых вирусов, которые были взяты в базе данных National Center for Biotechnology Information, с помощью программы BioEdit [11]. В результате сравнительного анализа выявлены наиболее консервативные участки геномов ACLSV, АрMV и ASPV, для которых был произведен дизайн праймеров. Сконструированные праймеры были синтезированы компанией Mycrosynth (Швейцария).

Качество выделенной РНК определяли на электрофореграмме по разделению двух рибосомальных РНК (28S и 18S) и с помощью контрольного гена – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH) (рис. 1) [12].

Обратный праймер был использован для наработки кДНК вирусов, второй обратный праймер был использован для ПЦР реакции. Нарботка полученных кДНК проводилась на термоциклере, температурный режим для реакции ПЦР был подобран эмпирически, в зависимости от температуры плавления праймеров. Используемый температурно-временной режим при амплификации:

пре-денатурация, 940°C – 2 мин;

а) денатурация, 940°C – 30 с; отжиг, 600°C – 30 с (3 цикла); элонгация, 720°C – 1 мин – 30 с;

б) денатурация, 940°C – 30 с; отжиг, 660°C – 30 с (30 циклов); элонгация, 720°C – 1 мин.

Финальная элонгация, 720°C – 10 мин (рис. 1).

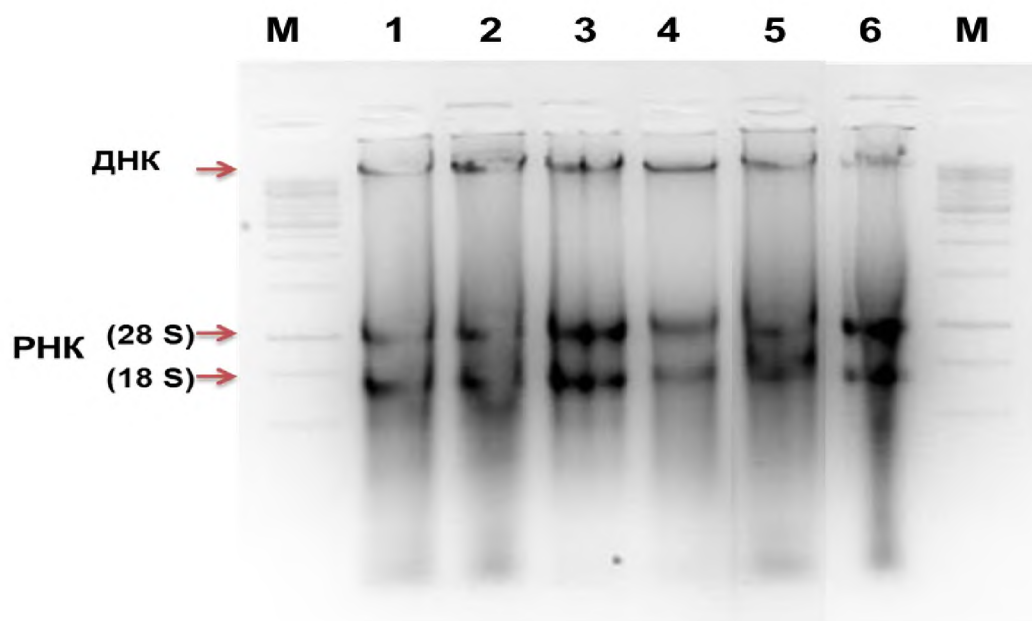


Рис. 1 Электрофорез в 2 % агарозном геле тотальной РНК, выделенной из листьев 6 образцов яблони.

1 – 'Апорт Александр', 2 – 'Голд Раш', 3 – 'Ред Фри', 4 – 'Ренет Ландсбергский', 5 – 'Суйслеппер', 6 – 'Б 7-35', М – молекулярный маркер GeneRuler 1kb DNA Ladder Plus

По окончании электрофореза (напряжение 8 V/см) анализировали продукты ПЦР в 1% агарозном геле, содержащем 0,5 мкл/мл бромистого этидия (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) в 1x TAE буфере. Результат под ультрафиолетом в гельдокументирующей системе (табл. 1).

Таблица 1

Набор олигонуклеотидов для одновременного тестирования четырех вирусов яблони

Наименование вирусов	№	Последовательность нуклеотидов	Размер ПЦР продукта (пар нуклеотидов)
ACLSV	201805	TTCATGGAAAGACAGGGGCAA	677
	201806	AAGTCTACAGGCTATTTATTATAAGTCTAA	
ApMV	201807	AGGGTCCTGAGCAGTTCGAGA	264
	201808	GTTTGGAGGGGCTTCCCACT	
ASGV	201801	GAAGACGTGCTTCAACTAGC	579
	201802	TTTGTAGACCAGTGGCAAAGT	
ASPV	201803	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	370
	201804	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA	

Для корнеобразования оздоровленных *in vitro* растений использовали $\frac{1}{2}$ концентрации питательной среды МС с добавлением 0,25 мг/л ИМК, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. Растения выращивали в светокультуральной комнате при температурном режиме $24 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенность $40 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16/8 часовой фотопериод. Смесь чернозема, торфа и перлита в соотношении 50:40:10 использовали в качестве почвенного субстрата. Адаптацию саженцев проводили в полиэтиленовых горшках (250 мл) под колпаками в теплице, при температуре $12^\circ\text{--}28^\circ\text{C}$ при естественном освещении [13].

Статистическая обработка экспериментальных данных была проведена по методикам, описанным в пособии Г.Ф. Лакина «Биометрия» и в программном обеспечении для статистики SYSTAT [14-15].

Результаты и их обсуждение

Для освобождения растений от вирусов применяются различные биотехнологические методы. Например, в мировом научном сообществе широко используется метод криотерапии, его успешно применяют для удаления вирусов у различных культур [3-5] (рис. 2).

Рис. 2 *In vitro* растения яблони

А – на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с 30 г/л сахарозы, 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,01 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), 50 мг/л рибавирина, 4,0 г/л агара, 1,25 г/л джелрайта при pH 5,7; Б – корнеобразование на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС, 0,25 мг/л ИМК, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7.

Однако, авторам всех изученных источников по удалению вирусов с помощью криотерапии не удалось достигнуть 100% результата. Ранее нами также был использован метод криотерапии, процент элиминации составил 37,5%, сорт 'Апорт' кроваво-красный остался поражен вирусом ACLSV, а сорт 'Ренет Ландсбергский' вирусами ACLSV и ASPV [1]. Кроме того, криотерапию не применяли для сортов 'Голд Раш' (ACLSV, ASPV), 'Ред Фри' (ACLSV), 'Суйслеппер' (ACLSV, ASPV) и для клонового подвоя 'Б 7-35' (ASGV), вирусы которых были также ранее установлены. Поэтому в данном исследовании для оздоровления яблони нами был применен метод химиотерапии с противовирусным препаратом рибавирин с целью повысить процент оздоровленных от вирусов растений.

На первоначальном этапе важной задачей было рассчитать концентрацию рибавирина в питательной среде, потому, как многие авторы отмечают некроз побегов *in vitro* при высоких концентрациях препарата [5-7, 9]. В результате экспериментов выявлено, что нет некроза побегов *in vitro* при концентрации рибавирина 50 мг/л в питательной среде МС (см. рис. 2А). Концентрация рибавирина 75 и 100 мг/л оказалась губительной для образцов 'Апорт Александр' и 'Б 7-35' (некроз побегов – 100%). Для других образцов также отмечался достаточно высокий процент гибели побегов *in vitro* (табл. 2).

Таблица 2

Жизнеспособность *in vitro* побегов яблони, культивируемых на среде Мурасиге и Скуга с различными концентрациями рибавирина

Наименование образца и вируса в исходном образце	Жизнеспособность побегов на среде МС со 100 мг/л рибавирина, %	Жизнеспособность побегов на среде МС с 75 мг/л рибавирина, %	Жизнеспособность побегов на среде МС с 50 мг/л рибавирина, %
'Апорт Александр' (ACLSV+ApMV+ASPV)	0	0	95,0
'Голд Раш' (ACLSV+ASPV)	-	75,0	100
'Ред Фри' (ACLSV)	45,0	90,0	100
'Ренет Ландсбергский' (ACLSV+ASPV)	60,0	90,0	100
'Суйслеппер' (ACLSV+ASPV)	90,0	85,0	100
'Б 7-35' (ASGV)	-	0	95,0
Сред. ± ст. откл.	48,75±37,50 ^a	56,67±44,23 ^a	98,33±2,58 ^b
- Эксперимент не проводился			
Значения, обозначенные разными буквами, достоверно различаются между собой при p<0,01			

Уже после первого пассажа при проведении проверки на вирусы у клонового подвоя 'Б 7-35' вирусы не диагностировались. После второго пассажа вирусы не были обнаружены у сортов: 'Голд Раш', 'Ред Фри' и 'Суйслеппер' (рис. 3).

Отмечено, что после второго пассажа у сорта 'Ренет Ландсбергский' был обнаружен вирус ASPV, однако отметили наличие слабо амплифицированного ПЦР «продукта» на ген капсидного белка вируса. Для этого сорта, а также для сорта 'Апорт Александр' потребовалось 3 кратное культивирование на питательной среде с добавлением рибавирина для полного освобождения от вирусов. Соответственно все инфицированные растения становились безвирусными после 3 пассажей на вышеуказанную среду (табл. 3).

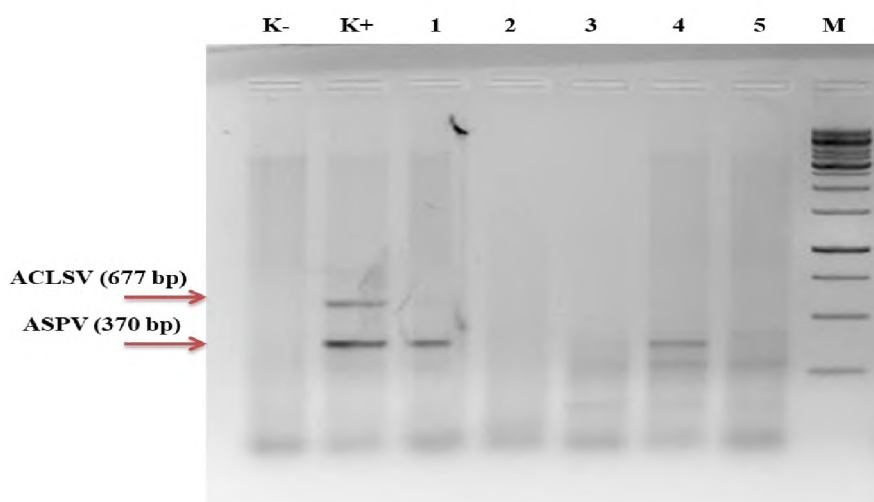


Рис. 3 Электрофорез в 2 % агарозном геле продуктов ОТ-ПЦР на вирусы ACLSV и ASPV
 К- - отрицательный контроль; К+ - положительный контроль; 1 – 'Апорт Александр', 2 – 'Голд Раш', 3 – 'Ред Фри', 4 – 'Ренет Ландсбергский', 5 – 'Суйслеппер', М – молекулярный маркер GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus

По результатам данных экспериментов можно сделать вывод, что химиотерапия – это эффективный метод оздоровления *in vitro* побегов яблони с результативностью – 100% (рис. 3). Этот метод подходит самостоятельно для оздоровления растений, а также в сочетании с другими биотехнологическими методами [5, 16] (табл. 3).

Таблица 3

Результаты обнаружения четырех вирусов (ACLSV, ASGV, ASPV, ArMV) в образцах яблони с помощью ОТ-ПЦР после химиотерапии, концентрация рибавирина 50 мг/л

Наименование образца и вируса в исходном образце	После одного культивирования на среде МС с 50 мг/л рибавирина	После двух культивирований на среде МС с 50 мг/л рибавирина	После трех культивирований на среде МС с 50 мг/л рибавирина
'Апорт Александр' (ACLSV+ ASPV+ArMV)	3 – без вирусов (15%) 17 – ACLSV+ASPV (85%)	4 – без вирусов (20%) 15 – ASPV (75%) 1 – некроз побегов (5%)	19 – без вирусов (100%)
'Голд Раш' (ACLSV+ASPV)	5 – без вирусов (25%) 15 – ASPV (75%)	20 – без вирусов (100%)	-
'Ред Фри' (ACLSV)	10 – без вирусов (50%) 10 – ACLSV (50%)	20 – без вирусов (100%)	-
'Ренет Ландсбергский' (ACLSV+ASPV)	4 – без вирусов (20%) 16 – ASPV (80%)	13 – без вирусов (65%) 7 – ASPV (35%)	20 – без вирусов (100%)
'Суйслеппер' (ACLSV+ASPV)	14 – без вирусов (70%) 6 – ASPV (30%)	20 – без вирусов (100%)	-
'Б 7-35' (ASGV)	19 – без вирусов (95%) 1 – некроз побегов (5%)	-	-
Безвирусные растения, % Сред. ± ст. откл.	45,83±31,85 ^a	88,0±16,81 ^b	100,0±0 ^b
- Эксперимент не проводился Значения, обозначенные разными буквами, достоверно различаются между собой при $p < 0,01$			

Для яблони, при производстве безвирусных саженцев необходимо в первую очередь получить растения с корнями в культуре *in vitro*. В лаборатории криосохранения гермоплазмы в результате многолетних исследований оптимизированы составы питательных сред для укоренения пробирочных растений разных видов [13].

Для корнеобразования была выбрана питательная среда: $\frac{1}{2}$ МС, 0,25 мг/л ИМК, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7 (рис. 2Б). В результате проведенного эксперимента получено от 50% до 90% корнеобразования в культуре *in vitro*. При этом первые мощные корни с множеством придаточных корешков появлялись уже через неделю.

После образования корней пробирочные растения переводили в почвенный субстрат (50% чернозем, 40% торф, 10% перлит). Это достаточно сложный процесс. На адаптацию растений-регенерантов к почвенному субстрату и условиям теплицы после перевода из культуры *in vitro* влияют различные факторы, например, влажность воздуха, кислотность почвы, температура и освещенность в теплице и др. У растений при перенесении в почву отмечается высокий процент гибели, на первом этапе может наблюдаться заторможенность роста, увядание и сбрасывание листьев [13, 17]. Поэтому сначала растения с корнями помещали в субстрат, для сохранения влаги, накрывали их прозрачными колпаками, под которыми растения также были защищены еще и от внешних воздействий (рис. 4А).



Рис. 4 Адаптация саженцев в условиях теплицы

А – Первый этап адаптации саженцев к почвенному субстрату (саженцы накрыты пластиковыми колпаками); Б – Саженцы готовые к пересадке в открытый грунт

Через неделю проводили проветривание растений, для чего на 10-15 мин убрали колпаки, в последствии длительность проветривания увеличивали до 8 часов. Для полной адаптации растений требуется от 3 до 6 недель. В итоге приживаемость составила 85-90% (рис. 4Б).

В результате проделанной работы создана безвирусная *in vitro* коллекция и получены безвирусные саженцы. Безвирусную коллекцию *in vitro* в дальнейшем можно использовать для научных исследований, для создания криогенных коллекций, а также для дальнейшего производства элитных безвирусных саженцев.

Выводы

1. Химиотерапия является эффективным подходом для оздоровления *in vitro* побегов с результативностью – 100%. Для достижения 100% результативности требуется 3 пассажа *in vitro* побегов по 45 дней на питательную среду с рибавирином в концентрации – 50 мг/л (некроз – 1,67%). При более высоких концентрациях рибавирина – 75 и 100 мг/л выявлен некроз, составляющий 100% у некоторых образцов. В результате проделанной работы создана безвирусная *in vitro* коллекция.

2. Для успешного ускоренного корнеобразования *in vitro* побегов эффективна питательная среда: ½ МС, 0,25 мг/л ИМК, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, pH 5,7. В результате корнеобразование получено в среднем у 79% *in vitro* побегов.

3. Для адаптации укорененных *in vitro* побегов к почвенному субстрату (50% чернозем, 40% торф, 10% перлит) и условиям теплицы требуется накрывать растения-регенеранты пластиковыми колпаками в течение 3-6 недель для сохранения влаги и защиты от внешних воздействий. В результате приживаемость составила 85-90%.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках Программно-целевого финансирования OR11465424

Список литературы

1. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биол. спец. вузов / 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1990. – 352 с.
2. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Сборник научных трудов Главного Никитского ботанического сада. – 2014. – Т. 138. – С. 5-56.
3. Ромаданова Н.В., Нурманов М.М., Махмудова И.А., Кушнарченко С.В. Производство супер-элитных саженцев сортов и клоновых подвоев яблони // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина (междисциплинарный). – 2018. – Т. 3(98). – С. 4-13.
4. Ухатова Ю.В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур // Автореф. диссертации. Наука, 2017. – 22 с.
5. Bettoni J.C., Mathew L., Pathirana R., Wiedow C., Hunter D.A., McLachlan A., Khan S., Tang J., Nadarajan J. Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M From Infected in vitro-Grown Potato Shoots Using in vitro Therapies // Frontiers in Plant Science. – 2022. – Vol. 13.
6. Cassells A.C., Long R.D. The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of Virazole // Potato Res. – 1982. – Vol. 25. – P. 165-173.
7. Danci O., Erdei L., Vidacs L., Danci M. et al. Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication // J. of Horticulture, Forestry and Biotechnology. – 2009. – Vol. 13. – P. 421-425.
8. Fira A. In vitro rooting and ex-vitro acclimation in apple (*Malus domestica*) // Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med. – 2010. – Vol. 67. – N. 1. – P. 480.
9. Kushnarenko S.V., Romadanova N.V., Aralbayeva M.M., Zholamanova S.Z. 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 Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2017. – Vol. 53(361). – P. 1-8.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – P. 473-479.
11. National Center for Biotechnology Information. – [Электронный ресурс] – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/BioEdit.html>
12. Paprštein F., Sedlák J., Svobodová L., Polák J. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance – Short communication // *Hort. Sci. (Prague).* – 2013. – Vol. 40. – N. 4. – P. 186-190.
13. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Gritsenko D.A., Omasheva M.Y., Galiakparov N.N., Reed B.M., Kushnarenko S.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.) // *Cryo Letters. London.* – 2016. – Vol. 37(1). – P. 1-9.
14. Romadanova N.V., Mishustina S.A., Matakova G.N., Kuhsnarenko S.V., Rakhimbaev I.R., Reed B.M. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan // *Acta Horticulturae.* – 2016. – Vol. 1113. – P. 271-277.
15. SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
16. Tan R., Wang L., Hong N., Wang G. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear Plant Cell // *Tissue and Organ Culture.* – 2010. – Vol. 101. – N. 2. – P. 229-235.
17. Wang Q., Cuellar W.J., Rajamaki M. 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 // *Mol. Plant Pathol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 237-250.

Статья поступила в редакцию 12.05.2022 г.

Romadanova N.V., Tolegen A.B., Kushnarenko S.V. Development of biotechnology of virus elimination in micropropagated *Malus* Sp. and obtaining virus-free planting stocks // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2022. – № 144 – P. 105-113

Chemotherapy with ribavirin has been used as a method for healthy *in vitro* apple shoots obtaining. Three subcultures of *in vitro* plants for 45 days each on Murashige and Skoog medium with 50 mg/L of ribavirin resulted in virus elimination with 100% efficiency. Half concentration of Murashige and Skoog mineral components with 0.25 mg/L indolylbutyric acid, 1.25 g/L gelrite, 4 g/L agar, pH 5.7 was efficient for *in vitro* root formation (50-90%). At the first stage, for the adaptation of apple plants (85-90%) at the soil substrate, after transferring shoots from *in vitro* conditions, it is necessary to cover them with a plastic cap to retain moisture. Uniform ventilation of the planting stocks is required to prevent the formation of rot and mold.

Key words: *malus; chemotherapy; in vitro shoots; ribavirin; virus-free planting stocks*