

# СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНЫХ САДОВЫХ КУЛЬТУР

**Папихин Роман Валериевич<sup>1</sup>**

кандидат с.-х. наук, доцент

**Муратова Светлана Александровна<sup>2</sup>**

кандидат биол. наук, доцент

**Дубровский Максим Леонидович<sup>3</sup>**

кандидат с.-х. наук, доцент

**Кирина Ирина Борисовна<sup>4</sup>**

кандидат с.-х. наук, доцент

**Комарова Елена Викторовна<sup>5</sup>**

Аспирант

Мичуринский государственный аграрный университет,

г. Мичуринск, Россия

**Аннотация.** В статье описана проблема заражения садовых культур вирусной инфекцией. Рассмотрены современные способы её устранения, с учётом мирового опыта, с помощью химических и физических факторов воздействия и их различного сочетания.

**Ключевые слова:** садовые культуры, культура *in vitro*, вирусная инфекция, химиотерапия, термотерапия, криотерапия.

---

<sup>1</sup>Папихин Р.В. [ragom10@mail.ru](mailto:ragom10@mail.ru)

<sup>2</sup>Муратова С.А., [smuratova@yandex.ru](mailto:smuratova@yandex.ru)

<sup>3</sup>Дубровский М.Л., [element68@mail.ru](mailto:element68@mail.ru)

<sup>4</sup>Кирина И.Б., [rodina1947@mail.ru](mailto:rodina1947@mail.ru)

<sup>5</sup>Комарова Е.В., [grigorieva-elena1615@yandex.ru](mailto:grigorieva-elena1615@yandex.ru)

Вирусы растений являются облигатными внутриклеточными паразитами, которые развиваются только внутри живых клеток хозяина и могут передаваться вегетативным размножением из поколения к поколению, а также некоторыми насекомыми от зараженных вирусом растений здоровым.

Вирусные болезни значительно снижают продуктивность садовых культур. В первую очередь, они имеют первостепенное значение в питомниках, уменьшая процент приживаемости прививок, окореняемости и адаптации в целом при вегетативном размножении. Вирусные патогены на фоне неблагоприятных абиотических и биотических факторов приводят к массовой гибели культур или резкому снижению объёма и качества урожая [1-6], который в дальнейшем не пригоден даже для переработки продукции [7-10].

Для эффективного регулирования вирусных заболеваний на протяжении всей истории их контроля используют некоторые химические вещества. Культивирование безвирусных растений было и остаётся одним из основных сельскохозяйственных направлений [11].

Существует несколько стратегий оздоровления растений от вирусной инфекции. Наиболее распространены термотерапевтические методы.

Суть метода заключается в воздействии высоких для биологических систем температур на инфицированные культуры *in vitro*. Чем выше температура и чем больше длительность экспозиции, тем выше частота вирусной эрадикации. Зачастую, при воздействии на целые растения применяется термотерапия 35-42°C в течение 4-6 недель, варьирование этих условий определяется типом вируса и видом растения, и взаимоотношением вирус-хозяин [12].

Выбор режима термотерапии должен позволить обработанному растению выжить и в то же время инактивировать вирус, таким образом, в результате этого получают безвирусное растение.

Для повышения эффективности термотерапии её применяют в культуре ткани. Этот метод включает в себя термотерапию заражённого растения *in vitro*, а затем культуру ткани (меристемы). Например, в своей работе Ф. Скиада с коллегами [13] сообщили, что комбинируют термотерапию с культурой ткани для уничтожения вируса скручивания листьев винограда (GLRaV-1), который является легко уничтожаемым и вируса виноградной лозы (GRSPaV), трудно уничтожаемого вируса, винограда сорта «Agiorgitiko». *In vitro* побеги, инфицированные вирусами GLRaV-1 и GRSPaV подвергали термообработке в течение 6 недель при температуре 40°C / 37°C (день / ночь), с последующим культивированием меристем. Эта процедура привела к 53% выживаемости термообработанных побегов, 56% регенерации меристем побегов, а также 91% GLRaV-1 и 74% GRSPaV безвирусных растений.

Для повышения эффективности эрадикации вирусов применяют сочетание химиотерапии с термотерапией и культурой меристем.

В этом методе культивируют пораженные вирусами *in vitro* побеги на среде содержащей противовирусные препараты, а затем подвергают их термообработке, после чего культивируют меристемы. В некоторых случаях заражённые побеги *in vitro* вначале подвергают термообработке, а затем культивируют на противовирусных препаратах, содержащихся в среде, следующим этапом идёт культивирование меристем [14]. Несмотря на то, что известно несколько противовирусных препаратов растений, наиболее часто используют рибавирин, реже для уничтожения вирусов применяют 2-тиоурацил [15]. Концентрация противовирусных агентов, варьирует от 20-50 мг/L<sup>-1</sup> для рибавирина [1, 5] и 25-40 мг/L<sup>-1</sup> для 2-тиоурацила [16], в зависимости от типов вируса и хозяина, а также комбинации вирусов и хозяина.

П. Флетчер и Д. Флетчер [17] сообщили, что комбинируют химиотерапию с термотерапией для уничтожения вирусов у кислицы клубненосной (*Oxalis tuberosa*), улюко клубненосный (*Ullucus tuberosus*) и

арракача съедобная (*Arracacia xanthorrhiz*). Заражённые побеги *in vitro* выращивали на среде размножения MS, дополненной 50 мг/л<sup>-1</sup> рибавирином, который добавляли в среду перед автоклавированием, а затем культуру подвергали термообработке 35°C/31°C (день/ночь). После 10 дней термотерапии, новые побеги (длинной 1 см), развитые из боковых побегов кислицы и уллоко, а также верхушечные почки арракачи были срезаны и затем культивировались на такой же среде без рибавирина.

При использовании этого протокола выжило около 80% эксплантов на всех трех культурах. Регенерировавшие растения не были заражены вирусом арракачи В (AVB), вируса мозаики папайи (PapMV).

Сочетание химиотерапии с термотерапией использовали и при оздоровлении заражённых побегов *in vitro* яблони [18]. Вирусинфицированные побеги яблони *in vitro* культивировали на среде MS, дополненной 25 мкг/мл<sup>-1</sup> рибавирином. Культуры затем подвергали термообработке при постоянной температуре 36°C. Через 20 дней термотерапии выделяли меристемы (1,0 мм) из образованных побегов и культивируемых до дальнейшей регенерации побегов. Около 90% побегов при такой схеме воздействия выжило. Все меристемы регенерировали в побеги, которые были свободны от яблоневого вируса хлороза листьев (ACLSV), вируса ямчатости древесины яблони (ASPV) и ASGV.

Сочетание химиотерапии с термотерапией часто используется для уничтожения вируса в травянистых культурах, а иногда и в древесных растениях.

В последнее время, распространён метод сочетания термотерапии с криотерапией побегов. Криотерапия применяется для меристем побегов в течение короткого времени в жидком азоте. Когда меристемы побегов замораживаются в N<sub>2</sub>, только клетки в верхней части апекса способны выжить, в то время как клетки в нижние части побега погибают [19].

Поскольку, вирус неравномерно распределен внутри растений, концентрация его возрастает с удалением от меристемы. Таким образом,

растения, полученные из апекса побега с использованием криотерапии могут быть свободны от вирусной инфекции. Криотерапия побегов оказалась намного более эффективной для уничтожения вирусов, чем традиционные методы, такие как культура апикальных меристем [20]. Тем не менее, криотерапия не может уничтожить вирусы, которые могут заразить меристематические клетки побегов (RBDV, ASGV, PFBV, PLPV) [21].

Ванг с коллегами Wang et al. [22] сообщили, что комбинируют термотерапию с криотерапией для уничтожения вируса пушистой карликовости малины RBDV. *In vitro* RBDV-инфицированные побеги малины (*Rubus idaeus*) были подвергнуты термообработке с использованием переменной температуры 38°C/26°C (день/ночь) при 16-часовом фотопериоде. После 28-35 дней термотерапии, верхушки побегов (размером 0,2 мм) содержащих два листовых зачатка, были вырезаны из обработанных побегов и использовались для криотерапии. После этой процедуры выживаемость составила 20-36% и 30-40% побегов после криотерапии. Около 30-35% растений выжило после сочетания термотерапии с криотерапией и при этом все были оздоровлены от RBDV [22].

Л. Жао с коллегами [19] показал, что сочетание термотерапии побегов с криотерапией эффективно уничтожает ASGV (вирус бороздчатости древесины яблони) - трудноизлечимый вирус. Побеги *in vitro* инфицированные ASGV подвергались термообработке с использованием чередующихся температур 36°C/32°C (день/ночь). Через 4 недели термотерапии, кончики побегов (размером 1,5 мм), содержащие 4-5 листовых зачатка вырезали из обработанных побегов и подвергали криотерапии, как описано. Это протокол позволил получить 33-76% повторного роста побегов и 30-100% частоты гибели вируса у четырех сортов яблони и одного подвоя. Авторы данного способа считают, что термотерапия с последующей криотерапией может быть наиболее эффективным методом для оздоровления от вирусов, чем все ранее разработанные методы.

Таким образом, мировые исследования в области получения безвирусных садовых культур являются перспективными и крайне востребованными для промышленного производства. На сегодняшний день разработана масса методик эрадикации вирусной инфекции у растений посредством физических и физических факторов воздействия и их различного сочетания.

### Список литературы

1. Дубровский М.Л. Оценка новых клоновых подвоев яблони селекции Мичуринского аграрного университета в питомнике конкурсного испытания / М.Л. Дубровский, Р.В. Папихин, А.В. Кружков, Н.Л. Чурикова, Л.В. Скороходова // Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК: Материалы XVI Международной науч. конф. Брянск, 2019. 614-618 с.
2. Papikhin R., Dubrovsky M. The statistical analysis of cytomorphological traits in the distant apple and pear F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> hybrids (*Malus* x *Pyrus*) from artificial and spontaneous outcrosses / R. Papikhin, M. Dubrovsky // Advances in Intelligent Systems Research. – 2019. – Volume 167. International Scientific and Practical Conference “Digitization of Agriculture – Development Strategy” (ISPC 2019). – P. 363-367.
3. Папихин Р.В., Маслова М.В. Устойчивость клоновых подвоев яблони к парше на естественном инфекционном фоне / Р.В. Папихин, М.В. Маслова // Плодоводство и виноградарство Юга России. 2016. № 42 (06). С. 13-22.
4. Чурикова Н.Л. Оценка способности к укоренению подвойных форм яблони в условиях *in vitro* / Н.Л. Чурикова, Д.О. Горлов, С.А. Муратова, Р.В. Папихин, З.Н. Тарова // В сборнике: Сборник научных трудов, посвященный 85-летию Мичуринского государственного аграрного университета Сборник научных трудов. В 4-х томах. Под редакцией В.А. Бабушкина. Мичуринск, 2016. С. 271-277.
5. Чурикова Н.Л. Влияние подвоя на морфометрические показатели привойного компонента в питомнике / Н.Л. Чурикова, Р.В. Папихин,

З.Н. Тарова, Л.В. Скороходова, Д.Ю. Честных// Вестник МичГАУ, №5, 2014. С. 14-19.

6. Лечебное садоводство: учебное пособие для вузов / И.Б. Кирина, И.А. Иванова, Н.С. Самигуллина. - 2-е изд. М.: Издательство Юрайт, 2019; Мичуринск: Изд-во Мичуринского госагроуниверситета. - 164 с.

7. Винницкая В.Ф. Разработка и создание функциональных продуктов из растительного сырья в Мичуринском государственном аграрном университете / В.Ф. Винницкая, Д.В. Акишин, О.В. Перфилова, Е.И. Попова и др. // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2013. - № 6. - С. 83-86.

8. Винницкая В.Ф. Оценка функциональных свойств малоиспользуемого местного растительного сырья и продуктов его переработки / В.Ф. Винницкая, Д.В. Акишин, О.В. Перфилова, С.И. Данилин // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. - 2017. - № 3. - С. 112-117.

9. Перфилова О.В. Яблочные выжимки как источник биологически активных веществ в технологии продуктов питания / О.В. Перфилова // Новые технологии. - 2017. - № 4. - С. 65-71.

10. Perfilova O.V. Quality of jelly marmalade from fruit and vegetable semi-finished products / O.V. Perfilova, V.A. Babushkin, G.O. Magomedov, M.G. Magomedov / International Journal of Pharmaceutical Research. - 2018. - V. 10. - № 4. - С. 721-724.

11. Barba M, Iardi V, Pasquini G. Control of pome and stone fruit virus diseases. In: Loebenstein G, Katis NI, editors. Advances in virus research, vol. 91. Burlington: Academic Press; 2015. p. 47–83.

12. Panattoni A., Luvisi A., Triolo E. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. / A. Panattoni, A. Luvisi, E. Triolo // Span J Agri Res. 2013. V.11. P. 173–88.

13. Skiada F.G. Elimination of Grapevine leafroll-associated virus 1 and Grapevine Rupestris pitting-associated virus from grapevine cv. Agiorgitiko and a

micropropagation of protocol for mass production of virus-free plantlets. / F.G. Skiada, K. Grigoriadou, V.I. Maliogka, N.I. Katis, E.P. Eleftheriou //J. Plant Pathol. 2009;91:177–84.

14. Cieślińska M. Elimination of *Apple chlorotic leafspot virus* (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy / M. Cieślińska // Acta Hortic. 2002. V. 596. P. 481–492.

15. Faccioli G. Control of potato viruses using meristem and stem-cuttings cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: Loebenstein G, Berger PH, Brunt AA, Lawson RH, editors. Virus and virus-like diseases of potato and production of seed-potatoes. Dordrecht: Kluwer; 2001. p. 365–90.

16. Singh B. Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. / B. Singh// J. Crop Sci. Biotechnol. 2015. V. 18. P. 341–348.

17. Fletcher P.J., Fletcher J.D. *In vitro* virus elimination in three Andean root crops: Oca (*Oxalis tuberosa*), ulluco (*Ullucus tuberosus*), and arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). / P.J. Fletcher, J.D. Fletcher //N. Z. J. Crop Hortic. Sci. 2001. V. 29. P. 23–27.

18. Hu G., Dong Y., Zhang Z., Fan X., Ren F., Zhou J. Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. / G. Hu, Y. Dong, Z. Zhang, X. Fan, F. Ren, J. Zhou //Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2015. V. 121. P. 435–443.

19. Zhao L. Combining the rmotherapy with cryotherapy for efficient eradication of *Apple stem grooving virus* (ASGV) from infected apple in vitro shoots. / L. Zhao, M-R. Wang, Z-H. Cui, L. Chen, Q-C. Wang // Plant Dis. 2018. V. 102. P. 1574–1580.

20. Wang Q.C., Valkonen J.P.T. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. / Q.C. Wang, J.P.T. Valkonen // Trend Plant Sci. 2009. V. 14. P. 119–222.

21. Wang M.R. *In vitro* thermotherapy based methods for plant virus eradication / M.R. Wang, Z.H. Cui, W. Li J, X.Y. Hao, L. Zhao, Q.C. Wang // Plant Methods. 2018. V. 14. P. :87.
22. Wang Q-C.. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. / Q-C. Wang, B. Panis, F. Engelmann, M. Lambardi, J.P.T. Valkonen //Ann Appl Biol. 2009. V. 154. P.351–363.

## METHODS FOR PRODUCING VIRUS-FREE GARDEN CROPS

**Papikhin R.V.**<sup>1</sup>

Candidate of agricultural sciences, associate Professor

**Muratova S.A.**<sup>2</sup>

Candidate of biological sciences, associate Professor

**Dubrovsky M.L.**<sup>3</sup>

Candidate of agricultural sciences, associate Professor

**Kirina I.B.**<sup>4</sup>

Candidate of agricultural sciences, associate Professor

**Komarova E.V.**<sup>5</sup>

post graduate study

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

**Annotation.** The article describes the problem of infection of garden crops with a viral infection. Modern methods of its elimination are considered, taking into account world experience, using chemical and physical factors of influence and their various combinations.

**Key words:** garden crops, in vitro culture, viral infection, chemotherapy, thermotherapy, cryotherapy.

<sup>1</sup> Papikhin R.V., parom10@mail.ru

<sup>2</sup> Muratova S.A., smuratova@yandex.ru

<sup>3</sup> Dubrovsky M.L., element68@mail.ru

<sup>4</sup> Kirina I.B., rodina1947@mail.ru

<sup>5</sup> Komarova E.V., grigorieva-elena1615@yandex.ru