

DOI 10.54596/2958-0048-2026-1-79-93

УДК 634.11:631.541.1

МРНТИ 68.35.53

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЗДОРОВЛЕНИЯ ПОДВОЕВ ЯБЛОНИ И ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА В КАЗАХСТАНЕ

Асқарова М.А.^{1,2*}, Юсупова З.Я.², Нурсейтова Т.Н.²,

Абдикаримова Р.А.², Саршаева М.Ж.,² Кабылбекова Б.Ж.²

^{1*}АО «Алматинский технологический университет» Алматы, Казахстан,

^{2*}ТОО «Казахский научно-исследовательский институт плодоводства»,
Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: moldyraskarova1@gmail.com

Аннотация

В промышленных садах и питомниках распространение вирусных инфекций яблони (*Malus domestica* Borkh.) представляет серьезную угрозу фитосанитарному состоянию и продуктивности растений. Целью исследования было получение безвирусного посадочного материала подвоев яблони и оценка эффективности комплексных биотехнологических методов оздоровления *in vitro*. Объектом исследования были подвой яблони из помологических и *in vitro* коллекций Казахстана. Наибольшая вирусная нагрузка была выявлена в подвое Б-16-20. Для оздоровления применяли комбинированный метод *Thermotherapy* + *Chemotherapy* + SAM с использованием противовирусных препаратов. Результаты показали, что эффективность и фитотоксичность методов зависят от сочетания методов и концентрации препаратов. Полученные данные подтверждают высокую эффективность комплексного применения биотехнологических подходов для получения безвирусного посадочного материала яблони и имеют практическое значение для сертифицированного размножения плодовых культур в Казахстане.

Ключевые слова: *Malus domestica*, подвой, вирусные инфекции, термотерапия, химиотерапия, культура апикальной меристемы, *in vitro*, оздоровление растений.

ҚАЗАҚСТАНДА АЛМА ТЕЛІТУШІЛЕРІН САУЫҚТЫРУДЫҢ ЖӘНЕ ВИРУССЫЗ ОТЫРҒЫЗУ МАТЕРИАЛЫН АЛУДЫҢ БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСТЕРІ

Асқарова М.А.^{1,2*}, Юсупова З.Я.², Нурсейтова Т.Н.²,

Абдикаримова Р.А.², Саршаева М.Ж.,² Кабылбекова Б.Ж.²

^{1*}«Алматы технологиялық университеті» АҚ, Алматы, Қазақстан

^{2*}«Қазақ жеміс-көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» ЖШС,
Алматы, Қазақстан

*Хат-хабар үшін автор: moldyraskarova1@gmail.com

Аңдатпа

Кешендік бақтар мен тәлімбақтарда алманың (*Malus domestica* Borkh.) вирустық инфекцияларының таралуы өсімдіктердің фитосанитарлық жағдайы мен өнімділігіне айтарлықтай қауіп төндіреді. Зерттеудің мақсаты – алма телітушілерін вирустан сауықтыру және *in vitro* кешенді биотехнологиялық сауықтыру әдістерінің тиімділігін бағалау. Зерттеу нысаны ретінде Қазақстандағы помологиялық және *in vitro* коллекциялардан алынған алма телітушілері. Ең жоғары вирустық жүктеме Б-16-20 телітушісінде анықталды. Сауықтыру үшін *Thermotherapy* + *Chemotherapy* + SAM кешенді әдісі, сондай-ақ вирустарға қарсы препараттар қолданылды. Нәтижелер көрсеткендей, әдістердің тиімділігі мен уыттылық әсері қолданылған әдістердің комбинациясына және препараттардың концентрациясына байланысты болды.

Алынған деректер алма телітушілерін вирустан сауықтыруда кешенді биотехнологиялық тәсілдердің жоғары тиімділігін растайды және Қазақстанда сертифицикатталған алма телітушілерін көбейтуде практикалық мәнге ие.

Кілт сөздер: *Malus domestica*, телітуші, вирусные инфекциялары, термотерапия, химиотерапия, апикальді меристема мәдениеті, *in vitro*, сауықтыру.

BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR THE SANITATION OF APPLE ROOTSTOCKS AND THE PRODUCTION OF VIRUS-FREE PLANTING MATERIAL IN KAZAKHSTAN

M.A. Askarova^{1,2*}, Z.Ya. Yusupova², T.N. Nurseitova²,

R.A. Abdikarimova², M.Zh. Sarshaeva², B.Zh. Kabyzbekova²

^{1*}JSC Almaty Technological University, Almaty, Kazakhstan

^{2*}LLP Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute, Almaty, Kazakhstan

*Corresponding author: moldyraskarova1@gmail.com

Abstract

In commercial orchards and nurseries, the spread of viral infections in apple (*Malus domestica* Borkh.) poses a serious threat to plant phytosanitary status and productivity. The aim of this study was to obtain virus-free apple rootstock planting material and to evaluate the effectiveness of integrated *in vitro* biotechnological methods of plant sanitation. The objects of the study were apple rootstocks from pomological and *in vitro* collections in Kazakhstan. The highest viral load was detected in rootstock B-16-20. For sanitation, a combined Thermotherapy + Chemotherapy + SAM method with antiviral agents was applied. The results showed that the effectiveness and phytotoxicity of the methods depend on the combination of techniques and the concentration of the applied agents. The obtained data confirm the high efficiency of integrated biotechnological approaches for obtaining virus-free apple planting material and have practical significance for certified propagation of fruit crops in Kazakhstan.

Keywords: *Malus domestica*, rootstock, viral infections, thermotherapy, chemotherapy, apical meristem culture, *in vitro*, plant sanitation.

Введение

Яблоня (*Malus domestica*) представляет собой многолетнюю плодовую культуру семейства *Rosaceae* и имеет высокое экономическое значение [1]. Она широко возделывается в регионах с умеренным климатом, включая территорию Казахстана [2]. Вегетативное размножение яблони, осуществляемое преимущественно путём черенкования и прививки, способствует передаче и накоплению вирусных инфекций от инфицированных растений к здоровому посадочному материалу. В этой связи своевременное выявление и устранение вирусных патогенов в питомниках и промышленных насаждениях является необходимым условием предотвращения их распространения и получения безвирусного посадочного материала.

Получение безвирусного посадочного материала является одним из ключевых условий обеспечения устойчивого выращивания плодовых культур [3]. Производство безвирусных подвоев яблони имеет ключевое значение для сохранения фитосанитарного состояния, высокой продуктивности и долгосрочной устойчивости плодовых насаждений. Среди многочисленных биотических факторов стресса вирусные инфекции растений представляют одну из наиболее серьёзных угроз для здоровья плодовых культур, поскольку их распространение приводит к существенным агрономическим и экономическим потерям [4].

Вирусные инфекции плодовых деревьев, включая яблоню, характеризуются рядом типичных симптомов: замедленным ростом, хлорозом листовой поверхности, мозаичными проявлениями, снижением массы и деформацией плодов, а также их преждевременным опадением. Такие поражения оказывают существенное негативное воздействие на урожайность и товарные качества плодов [5]. На сегодняшний день установлено, что более 30 вирусов и вироидов способны инфицировать яблоню, создавая значительную угрозу для её фитосанитарного состояния и продуктивности [6]. К числу наиболее распространённых вирусных патогенов яблони относятся ApMV, AGCaV, ACLSV, ASGV и вирус ASPV, которые относятся к семейству *Betaflexiviridae* [7].

Эффективных методов борьбы с вирусными инфекциями в зрелых насаждениях не существует, поэтому получение безвирусного посадочного материала рассматривается как ключевое условие устойчивого развития плодового хозяйства. По данным ряда исследований, замена инфицированного посадочного материала на оздоровлённый позволяет повысить урожайность до 30 %.

Использование оздоровленного посадочного материала является одним из ключевых факторов обеспечения высокой урожайности и качества продукции. По мнению Национального Сообщества чистых растений (США, *National Clean Plant Network*) и ряда других исследователей, методы *in vitro*, включая меристемную культуру, представляют собой наиболее успешный подход к элиминации вирусов из растительного материала, при этом общий уровень успешного оздоровления часто превышает 85 %.

Для повышения эффективности элиминации вирусов культуру меристемы часто сочетают с термотерапией и химиотерапией. Комбинированное применение этих методов позволяет снизить вирусную нагрузку, однако эффективность оздоровления зависит от чувствительности вирусов, используемых препаратов и физиологических особенностей генотипа растения. При этом противовирусные препараты могут вызывать фитотоксические эффекты, что требует подбора оптимальных условий терапии.

Согласно литературным данным, сочетание термотерапии с последующим культивированием апикальной меристемы является одним из наиболее эффективных методов элиминации вирусов из инфицированных растений. Оптимальные режимы термотерапии способствуют снижению вирусной нагрузки и предотвращают распространение вируса в меристематические клетки, что обеспечивает формирование безвирусных побегов. Вместе с тем эффективность метода зависит от чувствительности конкретных вирусов, а длительное термическое воздействие может негативно влиять на жизнеспособность растений [8,9].

В то же время метод химиотерапии, применяемый в сочетании с культурой апикальной меристемы, позволяет подавлять вирусную активность в тканях растений. Однако, эффективность данного подхода ограничена тесной интеграцией вирусов в клеточные процессы растения-хозяина, что может приводить к фитотоксическим эффектам. Наиболее широко используемым противовирусным препаратом для химиотерапии растений является рибавирин, эффективность которого подтверждена в ряде исследований. Вместе с тем поиск препаратов с более широким спектром действия и меньшей фитотоксичностью остаётся актуальным направлением исследований [10,11].

В связи с этим актуальной задачей является оценка эффективности комплексных биотехнологических методов оздоровления подвоев яблони с использованием противовирусных препаратов.

Цель настоящего исследования – получение оздоровленного посадочного материала подвоев яблони (*Malus domestica* Borkh.) и оценка влияния противовирусных препаратов на подавление вирусной инфекции в растительных тканях.

Материалы и методы

Объектом исследования были 30 образцов подвоев яблони, полученные из помологических и *in vitro* коллекций КазНИИПО, Уральской сельскохозяйственной станции, КазНАИУ и питомников Алматинской области, изученные в полевых и лабораторных условиях.

Отбор растительного материала

Отбор проб проводился в период вегетации растений (март – сентябрь 2024-2025 гг.), а ПЦР-исследования выполнялись летом. Образцы были собраны в соответствии со стандартами ЕРРО (PM 7/76 (1) – Sampling of plants for laboratory testing; PM 4/27 (3) – Certification scheme for Malus, Pyrus and Cydonia, 2023) [12,13]. В исследование включались листья с признаками вирусных инфекций. Каждый генотип (образец) представлял собой одно дерево. С каждого растения отбирали 15–20 полностью развитых листьев в четырёх направлениях – восток, запад, север, юг. Образцы хранились при +4 °С до выделения РНК.

Выделение РНК и анализ методом RT-PCR

Общая РНК выделялась из измельчённых листьев (200 мг) с применением набора «ФитоСорб» (ООО «Синтол») по модифицированному протоколу Mekuria et al. (2003) [14]. Экстракционный буфер содержал 4,4 % ПВП-40 и 1 % метабисульфита натрия.

Качество РНК оценивали спектрофотометрически (NanoDrop 1000, ThermoFisher). Чистота определялась по соотношению OD260/280 и OD260/230 (1,8-2,3).

В исследовании анализировали девять патогенов: *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Apple stem pitting virus* (ASPV), *Apple mosaic virus* (ApMV), *Apple stem grooving virus* (ASGV), *Apple rubbery wood virus 1* (ARWV-1), *Apple rubbery wood virus 2* (ARWV-2), *Apple necrotic mosaic virus* (ApNMV), *Apple green crinkle-associated virus* (AGCaV) и *Apple hammerhead viroid* (AHVd).

Детекцию проводили с использованием специфических праймеров, приведённых в таблице 1. Для выявления всех девяти патогенов применяли опубликованные праймеры (последовательности представлены в направлении 5'→3').

Таблица 1. Праймеры для детекции вирусных и виридных патогенов

Вирусы	Последовательности праймеров для детекции вирусов	Ссылки
1	2	3
ACLSV	(F) CCATCTTCGCGAACATAGC (R)GTCTACAGGCTATTTATTATAAG	[15]
ApMV	(F) TCATTGGATCCSTTTGCTTC (R) AAACCTCGTCGTCCTATCC	[16]
ASGV	(F) AGACTTGGGTCATTGGCAATAAT (R) TGGCGTCCTTGTAAGCTCCGAT	[15]
ASPV	(F) GGAATCAGATTATGAGGCAT (R) CACATATCTGAAATTGAGAT	
ARWV1	(F) TGCCAAAAGGATCTGAAGGA (R)TTATTTGGCTATCTGATTGACGAA	[17]

ARWV2	(F) ACAAGGCAGTAGTTATTATCAGCAA (R) TTCTGCAACTAACTTCAAGGCTG	[17]
ApNMV	(F) CTTGCGTGCAATCGATATGG (R) TCATCTCAACCTAGACATCC	[17]
AGCaV	(F) GAAGTTCAGCCCCGATTGT (R) GGTGGAAATAGCTGAATCTC	[18]
AHVd	(F) ACCCCTCCGGTCTTATCCAA (R) CGTCCTTGGAACGGACTCAT (FAM)GACGGTCCGAGGCTATTAGC(BHQ1)	[19]

Для амплификации использовались наборы Real-Time PCR Detection Kit (LETGEN®) с праймерами и зондами (TaqMan®). Реакции выполнялись в системе CFX96 (Bio-Rad) с применением One-Step RT-PCR Kit (Qiagen). Объем реакции – 20 мкл; каждый образец анализировали в трёх повторностях. Использовались положительные и отрицательные контроли, $C_t \leq 35$ считался положительным, что подтверждало надёжность диагностики.

Термический режим циклирования был следующим:

Для вирусов ACLSV, ApMV, ASPV: 50 °C 10 мин (обратная транскрипция), 95 °C 2 мин (активация полимеразы), 40 циклов по 95 °C 10 с (денатурация) и 60 °C 30 с (отжиг/удлинение).

Для вирусов AGCaV, ARWV-1, ARWV-2, ApNMV: 50 °C 15 мин (обратная транскрипция), 95 °C 2 мин (активация полимеразы), 30 циклов по 95 °C 10 с (денатурация) и 60 °C 30 с (отжиг/удлинение).

Для вириода AHVd: 50 °C 15 мин (обратная транскрипция), 95 °C 2 мин (активация полимеразы), 40 циклов по 95 °C 10 с (денатурация) и 60 °C 30 с (отжиг/удлинение).

Оздоровление подвоев яблони методом Thermotherapy + Chemotherapy + SAM

Для оздоровления клоновых подвоев яблони, культивируемых *in vitro* и инфицированных вирусами, применяли биотехнологические методы Thermotherapy + Chemotherapy + SAM. Использование растений с множественной вирусной инфекцией позволило объективно оценить результативность комбинированного подхода, включающего термотерапию и химиотерапию с последующим культивированием апикальной меристемы побега (Thermotherapy + Chemotherapy + SAM).

В опыте химиотерапии в качестве противовирусных препаратов использовали рибавирин и фторурацил. Рибавирин применяли в концентрациях 25, 40 и 80 мг/л в соответствии с литературными данными, где данные дозы наиболее часто использовались для оздоровления растений *in vitro*. Фторурацил, как менее изученный препарат для подвоев яблони, использовали в одной концентрации 40 мг/л для предварительной оценки его эффективности и переносимости.

Рибавирин (Ribavirin Merck KGaA (Sigma-Aldrich), Германия.) (1-β-D-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) – противовирусное средство широкого спектра действия, ингибирующее репликацию вирусной РНК.

Фторурацил (5-Fluorouracil) – противовирусный препарат 5-фторурацил (5-fluorouracil) нарушает синтез ДНК и РНК.

Питательную среду с добавлением рибавирина автоклавировали при 121 °C в течение 20 минут. Фторурацил, как термолабильный препарат, готовили отдельно и асептически вносили в среду после автоклавирования и охлаждения. Побег культивировали при температуре 23 °C в течение 4 недель. Для каждой концентрации

препарата опыт закладывали в трёх повторностях, размещая по одному растению в каждой культуре.

Условия термокамеры: Для термотерапии растения выдерживали в термокамере в течение 2 недель при автоматически поддерживаемой температуре: дневная 37 °С (16 часов) и ночная 24 °С (8 часов). После завершения обработки с растений отбирали апикальные меристемы (SAM), растения переносили на стандартную питательную среду MS 100%, БАП 0,5 мг/л, ГК 0,2 мг/л, ИМК 0,1 мг/л без добавления препаратов. В ходе эксперимента проводились систематические наблюдения за ростом и состоянием растений.

Состав среды: Мурасиге и Скуга (MS) [20]. Среда готовилась на основе MS (100 мг/л) с добавлением мезоина – 100 мг/л, хелата Fe – 12 мг/л, пролина – 10 мг/л, глицина – 2 мг/л, витаминов В₁, В₂ и РР – по 0,5 мг/л, аскорбиновой кислоты – 1,5 мг/л, сахарозы – 30 г/л и агара – 5,65 г/л; рН доводили до 5,7.

Условия культивирования: Растения культивировались в климатической камере при фотопериоде 16/8 ч (день/ночь), температуре 23 ± 2 °С и освещённости 2000–3000 люкс. Через четыре недели после появления признаков роста проводили учёт состояния подвоев яблони, подвергнутых процедурам оздоровления.

Сбор и анализ данных

Выживаемость (%) рассчитывалась по 1 формуле:

$$\text{Выживаемость (\%)} = \frac{N_{\text{живых}}}{N_{\text{всего}}} \times 100 \quad 1$$

где:

N – живых число растений с признаками жизнеспособности;

N – всего общее число растений в варианте.

Учёт коэффициента размножения (Кр), отражающего способность растений к регенерации и образованию новых побегов после оздоровления. Значение Кр вычисляли по формуле 2:

$$Kp = \frac{N}{n} \quad 2$$

где:

N – общее количество полученных побегов (или растений) после цикла;

n – количество исходных эксплантов (посаженных проб).

Результаты исследований

В ходе молекулярной диагностики подвоев яблони (*Malus domestica* Borkh.) были исследованы девять патогенов: ACLSV, ASPV, AGCaV, ApMV, ASGV, ARWV-1, ARWV-2, ApNMV и вириод AHVd.

Из девяти тестируемых патогенов положительные результаты были получены по трём вирусам – ACLSV, ASPV и AGCaV. Остальные вирусы ApMV, ASGV, ARWV-1, ARWV-2, ApNMV и вириод AHVd в исследованных образцах не обнаружены (рисунок 1).

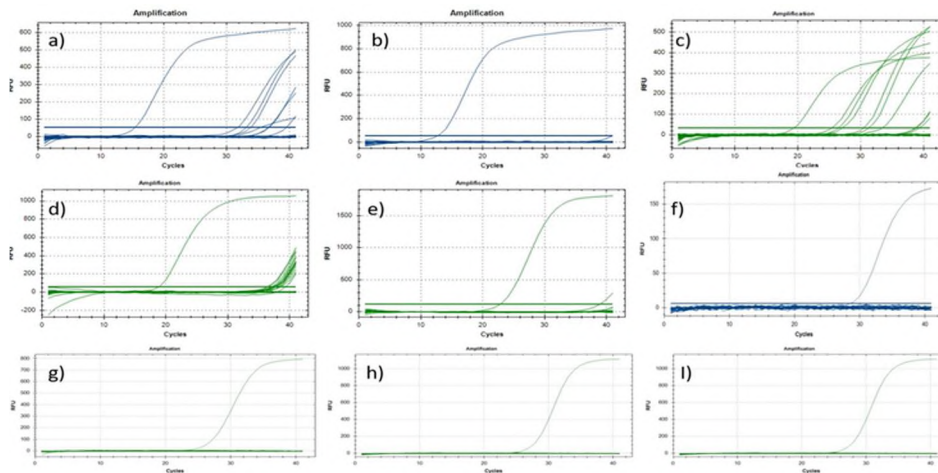


Рисунок 1. Результаты амплификации образцов методом RT-qPCR.

Положительные результаты: а) ACLSV; с) ASPV; d) AGCaV;
Отрицательные результаты: b) ApMV; f) ASGV; g) ApNMV; h) ARWV-1; i) ARWV-2 е)
AHVd

Вирус ACLSV был выявлен лишь в 3 образцах (10,0%) из 30 исследованных подвоев яблони: М-9 (питомниководческое хозяйство), Б-16-20 (коллекция базисных растений в защищённом грунте) и Б-7-35 (полевой участок КазНИИПО. Амплификационные кривые демонстрировали усиление сигнала на ранних циклах ($C_t < 30$), что подтверждает высокую вирусную нагрузку и достоверное присутствие ACLSV.

Вирус ASPV был обнаружен в пяти образцах (16,6%): М-9 (питомниководческое хозяйство), 6-4-8, Б-7-35, Б-16-20 (полевой участок) и АРМ-18 (2) (коллекция *in vitro*). Этот вирус демонстрировал более широкое распространение по сравнению с ACLSV. Зарегистрированные C_t значения варьировали от 20 до 35, что указывает на наличие как латентных, так и активных форм инфекции.

Вирус AGCaV оказался наиболее часто выявляемым патогеном и был зарегистрирован в 11 образцах (36,6%). Он обнаружен в подвоях Б-16-20, Б-7-35 (коллекция базисных растений), Б-16-20, Б-7-35, 6-4-8, (полевая коллекция), а также в сортах коллекции Жетысу (формы Жетысу 2, 3, 5, 6) и в образцах 62-396 (М), Жетысу-5. (полевая коллекция),

Среди исследованных 30 образцов подвоев яблони наибольшую вирусную нагрузку продемонстрировал подвой Б-16-20, в котором выявлено присутствие сразу трёх вирусов -AGCaV, ASPV и ACLSV. На основании результатов молекулярной диагностики для проведения оздоровительных мероприятий был выбран подвой Б-16-20, в котором методом RT-qPCR подтверждено наличие трёх вирусов (рисунок 2,3).



Рисунок 2. Интродукция подвоя яблони Б-16-20 в культуру *in vitro* с применением препарата рибавирин в концентрациях 25, 40 и 80 мг/л



Рисунок 3. Интродукция подвоя яблони Б-16-20 в культуру *in vitro* фторурацил в концентрации 40 мг/л

На этапе химиотерапии оздоровления подвоя яблони Б-16-20 растения высаживали на питательную среду с добавлением противовирусных препаратов и помещали в светокультуральную комнату на 3 недели для адаптации и начала роста. Далее образцы были перенесены в термокамеру (рисунок 4). После окончания термотерапии образцы извлекали из термокамеры и оценивали их состояние (рисунок 3). Применение методов терапии *in vitro* позволило получить регенерированные растения подвоя яблони Б-16-20, различающиеся по показателям выживаемости, доле безвирусных растений и коэффициенту размножения в зависимости от метода *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM* и используемого противовирусного препарата (таблица 2).



Рисунок 4. Подвои яблони Б-16-20, введённые в культуру *in vitro* с использованием метода *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM*

Таблица 2. Эффективность комплексных методов оздоровления и размножения подвоев яблони Б-16-20

Препарат	Содержание, мг/л	Фитосанитарный статус до терапии (ПЦР)	Растения до/после	Жизнеспособные растения после терапии, %	Выжившие /новые побеги	K _p после 4 недель культивирования
<i>Thermotherapy + Chemotherapy + SAM</i>						
рибавирин	25	AGCaV	9/6	66,6	6/6	1,0
	40	ASPV	9/8	88,8	6/4	0,6
	80	ACLSV	9/4	44,4	2/2	1,0
фторурацил	40		9/9	100	9/11	1,2

Thermotherapy + Chemotherapy + SAM показал существенные различия в жизнеспособности растений, выходе новых побегов и коэффициенте размножения.

При применении рибавирина эффективность терапии зависела от концентрации препарата. Так, при концентрации 25 мг/л жизнеспособность растений после терапии составила 66,6 %, при этом было получено 6 новых побегов, а коэффициент размножения через 4 недели культивирования составил 1,0. Увеличение концентрации рибавирина до 40 мг/л привело к повышению жизнеспособности растений до 88,8 %. Однако, количество новых побегов снизилось до 4, а коэффициент размножения составил 0,6, что указывает на угнетение регенерационной активности. При концентрации 80 мг/л отмечалось резкое снижение жизнеспособности растений до 44,4 %, формирование лишь 2 новых побегов, при коэффициенте размножения 1,0, что свидетельствует о выраженном фитотоксическом эффекте препарата в высокой дозе.

В отличие от рибавирина, применение фторурацила в концентрации 40 мг/л обеспечило 100 % жизнеспособность растений после терапии, получение 11 новых побегов, а также наивысший коэффициент размножения – 1,2. Кроме того, фторурацил не вызывал угнетения роста и побегообразования, что подтверждает его высокую биологическую эффективность и хорошую переносимость в условиях комплексной терапии.

В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что фторурацил превосходит рибавирин по всем основным показателям эффективности, включая жизнеспособность растений, выход новых побегов и коэффициент размножения, и может рассматриваться как наиболее перспективный препарат для оздоровления и размножения подвоя яблони Б-16-20 *in vitro* при использовании метода Thermotherapy + Chemotherapy + SAM.

Таким образом, фторурацил характеризовался более высокой выживаемостью и стабильным побегообразованием, что подтверждает его высокую эффективность в составе комплексной терапии.

Молекулярное повторное тестирование фитосанитарного состояния оздоровленных подвоев яблони.

С целью подтверждения фитосанитарного состояния подвоев яблони, оздоровленных растений была проведена повторная молекулярная диагностика. Из каждого варианта после противовирусной терапии отбирали хорошо развитые растения, из листовой ткани которых отбирали пробы массой 25 мг. В ходе молекулярной

диагностики повторно анализировали наличие тех же девяти патогенов, что и на этапе первичного обследования: ACLSV, ASPV, ApMV, ASGV, ARWV-1, ARWV-2, ApNMV, AGCaV и вириод AHVd.

Результаты RT-qPCR показали отсутствие амплификационных сигналов по всем указанным патогенам во всех исследованных образцах оздоровленных растений *in vitro* (рисунок 4). В ходе анализа использовались положительные и отрицательные контроли. Во всех реакциях были получены результаты, соответствующие отрицательным контролям, при этом значения Ct превышали диагностический порог либо не определялись. Полученные данные убедительно свидетельствуют об отсутствии вирусных и вириодных инфекций в оздоровленных растениях.

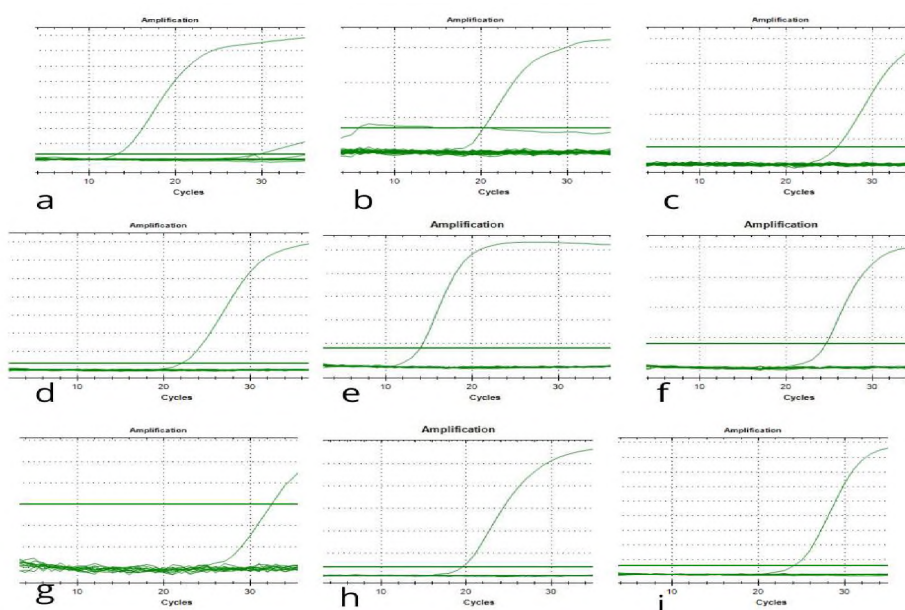


Рисунок 4. Результаты RT-qPCR-амплификации образцов подвоев яблони после оздоровления

a) ACLSV; b) ASPV; c) ApMV; d) ASGV; e) ARWV-1; f) ARWV-2;
 g) ApNMV; h) AGCaV; i) AHVd

Таким образом, в результате применения комбинации *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM*, *in vitro* растения, полученные из подвоя яблони Б-16-20, первоначально инфицированного вирусами AGCaV, ASPV и ACLSV, были полностью оздоровлены. Повторные молекулярные анализы подтвердили высокую эффективность применённого метода оздоровления и его пригодность для очистки подвоев яблони от комплексных вирусных инфекций.

Обсуждение

В ходе исследования в подвоях яблони выявлены вирусные патогены, при этом наибольшая вирусная нагрузка была отмечена в подвое Б-16-20, инфицированном AGCaV, ASPV и ACLSV. Для оздоровления применяли комбинированный метод *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM* с использованием противовирусных препаратов.

Комбинированный метод *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM* продемонстрировал наилучшие результаты, обеспечивая высокие показатели

выживаемости и доли безвирусных растений, что подтверждает, что термотерапия является эффективным подходом к оздоровлению растений, о чём свидетельствуют данные мировых исследований. Эти результаты согласуются с данными Sharma S., Singh B. [21], показавшими эффективность термотерапии с микропрививкой для устранения вируса ICRSV у Kinnow (*Citrus nobilis* × *Citrus deliciosa*), а также Hu G.-J., Dong Y.-F. и Zhang Z.-P. [22], продемонстрировавшими высокую эффективность термотерапии с микропрививкой меристем для элиминации ACLSV, ApNMV, ASPV и ASGV. Kwon Y.H. и соавт. [8] показали, что термотерапия повышает выживаемость и долю безвирусных растений карликовых подвоев яблони М.9 и М.26 по сравнению с химической обработкой. Cho I.S. и соавт. [15] отметили, что степень заражения вирусами зависит от их распределения в стебле и проникновения в меристему, поэтому термотерапию обычно комбинируют с культивированием верхушек побегов.

В отличие от термотерапии, точный механизм действия противовирусных препаратов изучен ограниченно, предполагается подавление репликации вирусов через ингибирование синтеза нуклеиновых кислот и активности РНК-полимеразы (Verma et al. [23]). При высоких концентрациях препараты могут вызывать фитотоксичность. Рибавирин проявил выраженное угнетение роста в данном эксперименте, аналогично наблюдениям Paprštejn и соавт. [24] и Kwon и соавт. [8]. Kabylbekova и соавт. [25] и Paunovic и соавт. [26] также отметили сортоспецифическую чувствительность растений к химиотерапии рибавирином при высоких дозах.

В настоящем исследовании рибавирин проявил выраженную фитотоксичность, что в ряде вариантов приводило к гибели растений подвоя Б-16-20. Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности данного генотипа к препарату, которая, вероятно, обусловлена не только дозой и продолжительностью воздействия, но и физиологическими особенностями подвоя.

Применение новых противовирусных препаратов широкого спектра действия, таких как фторурацил, показало высокую эффективность и хорошую переносимость при оздоровлении подвоя яблони Б-16-20 *in vitro* с использованием метода *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM*. В отличие от рибавирина, эти препараты не вызывали выраженного угнетения роста и побегообразования, что способствовало сохранению жизнеспособности растений и активному формированию новых побегов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения подобных препаратов в комплексной терапии для оздоровления и размножения подвоя, обеспечивая оптимальные показатели роста и развития растений.

Данное исследование демонстрирует важность применения эффективных методов оздоровления для получения безвирусного посадочного материала, необходимого для сертифицированного размножения плодовых культур.

Выводы

В ходе исследования показано, что комплексное применение методов *Thermotherapy + Chemotherapy + SAM* эффективно обеспечивает оздоровление подвоя яблони Б-16-20, инфицированного вирусами AGCaV, ASPV и ACLSV. Эффективность методов зависела от выбора противовирусного препарата и его концентрации. Результаты RT-qPCR подтвердили отсутствие вирусной и виroidной инфекции в оздоровленных растениях. Полученные данные демонстрируют высокую эффективность биотехнологических подходов для получения безвирусного посадочного материала яблони, что имеет практическое значение для сертифицированного размножения плодовых культур и поддержания фитосанитарного состояния садов в Казахстане.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках программно-целевого финансирования программы BR22885401. «Создание научно-обоснованной системы ведения безвирусного питомниководства в Казахстане».

Литература:

1. Ромаданова Н.В., Кушнарченко С.В. Биотехнология получения безвирусных саженцев яблони // *Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География»*. – 2021. – № 3(103). – С. 102-118. <http://dx.doi.org/10.31489/2021bmg3/102-118>.
2. Umer, M., Liu, J., You, H., Xu, C., Dong, K., Luo, N., Kong, L., Li, X., Hong, N., Wang, G., Fan, X., Kotta-Loizou, I., & Xu, W. (2019). Genomic, morphological and biological traits of the viruses infecting major fruit trees. *Viruses*, 11(6), 515. <https://doi.org/10.3390/v11060515>
3. Kang, C. M., Kim, M. J., Hong, J. S., & Jeong, R. D. (2025). Managing plant viruses in tissue cultured apple and grapevine: Strategies for detection and eradication. *Plant Pathology Journal*, 41(5), 545–565. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.07.2025.0092>
4. Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>
5. Tatineni, S., & Hein, G. L. (2023). Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virus disease management strategies. *Phytopathology*, 113(2), 117-141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0167-RVW>
6. Xiao, H., Hao, W., Storoschuk, G., MacDonald, J. L., & Sanfaçon, H. (2022). Characterizing the virome of apple orchards affected by rapid decline in the Okanagan and Similkameen valleys of British Columbia (Canada). *Pathogens*, 11, 1231. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111231>
7. Khan, Z. A., Diksha, D., Thapa, P., Mailem, Y. S., Sharma, S. K., Gupta, N., Kishan, G., Watpade, S., & Baranwal, V. K. (2024). Genome analysis of viruses of Phenuiviridae, Betaflexiviridae and Bromoviridae, and apple scar skin viroid in pear by high-throughput sequencing revealing host expansion of a rubodivirus and an ilarvirus. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 129, 102196. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102196>
8. Kwon, Y. H., Lee, J. K., Kim, H. K., Kim, K. O., Park, J. S., Huh, Y. S., Park, E. K., & Yoon, Y. J. (2019). Efficient virus elimination for apple dwarfing rootstock M.9 and M.26 via thermotherapy, ribavirin and apical meristem culture. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(3), 228-235. <https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.3.228>
9. Карпушина М. В., Супрун И. И. Методы и подходы к элиминации вирусов в условиях *in vitro* и *in vivo* // *Плодоводство и виноградарство Юга России*. – 2020. – № 63(3). – С. 254-269. <http://journal.kubansad.ru/pdf/20/03/19.pdf>
10. Кушнарченко С.В., Манапканова У.А., Рымханова Н.К., Турдиев Т.Т., Жумабаева Б.А., Аубакирова К.П., Галиакпаров Н.Н. Разработка *in vitro* технологии для элиминации вируса кустистой карликовости малины // *Вестник Карагандинского университета. Серия «Биология. Медицина. География»*. – 2023. – № 2 (110). – С. 76-84. <https://doi.org/10.31489/2023bmg2/76-84>
11. 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 Государственного Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН*. – Ялта, 2014. – Т. 138. – С. 5-56. <https://scbook.elpub.ru/jour>
12. EPPO. (2009). Certification scheme for pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia* (PM 4/27(1)). European and Mediterranean Plant Protection Organization. Retrieved August 22, 2025, from <https://www.eppo.int>
13. EPPO. (2021). PM 3/76 (2) Trees of *Malus*, *Pyrus*, *Cydonia* and *Prunus* spp.: Inspection of places of production. *EPPO Bulletin*, 51, 354-386. <https://doi.org/10.1111/epp.12771>

14. Mekuria, G., Ramesh, S. A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., & Sedgley, M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of *Prunus necrotic ring spot virus* and *prune dwarf virus* in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*, 114, 65–69. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.014>
15. Cho, I. S., Kim, J. H., Kim, H., Choi, H., & Lim, H. S. (2016). Deep sequencing analysis of apple infecting viruses in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 32(5), 441. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2016.0104>
16. Kinoti, W. M., Ratti, C., Constable, F. E., & Jones, R. A. C. (2018). The incidence and genetic diversity of apple mosaic virus (ApMV) and prune dwarf virus (PDV) in *Prunus* species in Australia. *Viruses*, 10(3), 136. <https://doi.org/10.3390/v10030136>
17. Hu, G. J., Li, Y., Yang, X., Zhang, Z., & Zhang, J. (2021). First report of apple rubbery wood virus 2 infection of apples in China. *Plant Disease*, 105(2), 519. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1451-PDN>
18. Baric, S. (2012). Quantitative real-time PCR analysis of ‘Candidatus Phytoplasma mali’ without external standard curves. *Erwerbs-Obstbau*, 54(3), 147-153. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10341-012-0166-7>
19. Zikeli, K., Kegler, H., & Rott, M. (2025). Prevalence, genetic diversity, and molecular detection of the apple hammerhead viroid in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1592572. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1592572>
20. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
21. Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A. A., Hallan, V. K., Nagpal, A. K., & Virk, G. S. (2008). *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 85-92. DOI: <https://doi.org/>
22. Hu, G.-J., Zhang, Z.-P., Dong, Y.-F., Fan, X.-D., Ren, F., & Zhu, H.-J. (2015). Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australasian Plant Pathology*, 44, 167-173. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-014-0334-3>
23. Verma, N., Ram, R., & Zaidi, A. A. (2005). *In vitro* production of *Prunus necrotic ringspot virus*-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.05.005>
24. Paprštejn, F., Sedlák, J., Svobodová, L., Polák, J., & Gadiou, S. (2013). Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance — Short communication. *Horticultural Science (Prague)*, 40(4), 186-190. <https://hortsci.agriculturejournals.cz/artkey/hor-201304-0008>
25. Kabylbekova, B., Nurseitova, T., Yussupova, Z., Turdiyev, T., Kovalchuk, I., Dolgikh, S., Soltanbekov, S., Seisenova, A., & Madenova, A. (2025). Application of *in vitro* techniques for elimination of Plum pox virus (PPV) and Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in stone fruits. *Horticulturae*, 11(6), 633. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060633>
26. Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., & Jevremovic, D. (2007). *In vitro* production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21, 417-421. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817486>

References:

1. Romadanova N.V., Kushnarenko S.V. Biotekhnologiya polucheniya bezvirusnyh sazhencev yabloni // Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya «Biologiya. Medicina. Geografiya». – 2021. – № 3(103). – S. 102-118. <http://dx.doi.org/10.31489/2021bmg3/102-118>.
2. Umer, M., Liu, J., You, H., Xu, C., Dong, K., Luo, N., Kong, L., Li, X., Hong, N., Wang, G., Fan, X., Kotta-Loizou, I., & Xu, W. (2019). Genomic, morphological and biological traits of the viruses infecting major fruit trees. *Viruses*, 11(6), 515. <https://doi.org/10.3390/v11060515>
3. Kang, C. M., Kim, M. J., Hong, J. S., & Jeong, R. D. (2025). Managing plant viruses in tissue cultured apple and grapevine: Strategies for detection and eradication. *Plant Pathology Journal*, 41(5), 545-565. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.07.2025.0092>
4. Jones, R. A. C., & Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387-409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>

5. Tatineni, S., & Hein, G. L. (2023). Plant viruses of agricultural importance: Current and future perspectives of virus disease management strategies. *Phytopathology*, 113(2), 117-141. <https://doi.org/10.1094/PHTO-05-22-0167-RVW>
6. Xiao, H., Hao, W., Storoschuk, G., MacDonald, J. L., & Sanfaçon, H. (2022). Characterizing the virome of apple orchards affected by rapid decline in the Okanagan and Similkameen valleys of British Columbia (Canada). *Pathogens*, 11, 1231. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111231>
7. Khan, Z. A., Diksha, D., Thapa, P., Mailem, Y. S., Sharma, S. K., Gupta, N., Kishan, G., Watpade, S., & Baranwal, V. K. (2024). Genome analysis of viruses of Phenuiviridae, Betaflexiviridae and Bromoviridae, and apple scar skin viroid in pear by high-throughput sequencing revealing host expansion of a rubodvirus and an ilarvirus. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 129, 102196. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102196>
8. Kwon, Y. H., Lee, J. K., Kim, H. K., Kim, K. O., Park, J. S., Huh, Y. S., Park, E. K., & Yoon, Y. J. (2019). Efficient virus elimination for apple dwarfing rootstock M.9 and M.26 via thermotherapy, ribavirin and apical meristem culture. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(3), 228-235. <https://doi.org/10.5010/JPB.2019.46.3.228>
9. Karpushina M. V., Suprun I. I. *Metody i podhody k eliminacii virusov v usloviyah in vitro i in vivo // Plodovodstvo i vinogradarstvo YUga Rossii. – 2020. – № 63(3). – S. 254-269. <http://journal.kubansad.ru/pdf/20/03/19.pdf>*
10. Kushnarenko S.V., Manapkanova U.A., Rymhanova N.K., Turdiev T.T., ZHumabaeva B.A., Aubakirova K.P., Galiakparov N.N. *Razrabotka in vitro tekhnologii dlya eliminacii virusa kustistoj karlikovosti maliny // Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya «Biologiya. Medicina. Geografiya». – 2023. – № 2 (110). – S. 76-84. <https://doi.org/10.31489/2023bmg2/76-84>*
11. Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova Sedoshenko N.P., Ivanova N.N. *Primenenie biotekhnologicheskikh metodov v ozdorovlenii rastenij i razmnozhenii bezvirusnogo posadochnogo materiala perspektivnyh cvetochno dekorativnyh kul'tur // Sbornik nauchnyh trudov Gosudarstvennogo Nikitskogo botanicheskogo sada – Nacional'nogo nauchnogo centra RAN. – YAlta, 2014. – T. 138. – S. 5 56. <https://scbook.elpub.ru/jour>*
12. EPPO. (2009). Certification scheme for pathogen-tested material of Malus, Pyrus and Cydonia (PM 4/27(1)). European and Mediterranean Plant Protection Organization. Retrieved August 22, 2025, from <https://www.eppo.int>
13. EPPO. (2021). PM 3/76 (2) Trees of Malus, Pyrus, Cydonia and Prunus spp.: Inspection of places of production. *EPPO Bulletin*, 51, 354-386. <https://doi.org/10.1111/epp.12771>
14. Mekuria, G., Ramesh, S. A., Alberts, E., Bertozzi, T., Wirthensohn, M., Collins, G., & Sedgley, M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*, 114, 65-69. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.014>
15. Cho, I. S., Kim, J. H., Kim, H., Choi, H., & Lim, H. S. (2016). Deep sequencing analysis of apple infecting viruses in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 32(5), 441. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2016.0104>
16. Kinoti, W. M., Ratti, C., Constable, F. E., & Jones, R. A. C. (2018). The incidence and genetic diversity of apple mosaic virus (ApMV) and prune dwarf virus (PDV) in Prunus species in Australia. *Viruses*, 10(3), 136. <https://doi.org/10.3390/v10030136>
17. Hu, G. J., Li, Y., Yang, X., Zhang, Z., & Zhang, J. (2021). First report of apple rubbery wood virus 2 infection of apples in China. *Plant Disease*, 105(2), 519. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1451-PDN>
18. Baric, S. (2012). Quantitative real-time PCR analysis of 'Candidatus Phytoplasma mali' without external standard curves. *Erwerbs-Obstbau*, 54(3), 147-153. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10341-012-0166-7>
19. Zikeli, K., Kegler, H., & Rott, M. (2025). Prevalence, genetic diversity, and molecular detection of the apple hammerhead viroid in Germany. *Frontiers in Microbiology*, 16, Article 1592572. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1592572>
20. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
21. Sharma, S., Singh, B., Rani, G., Zaidi, A. A., Hallan, V. K., Nagpal, A. K., & Virk, G. S. (2008). In vitro production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 85-92. DOI: <https://doi.org/>

22. Hu, G.-J., Zhang, Z.-P., Dong, Y.-F., Fan, X.-D., Ren, F., & Zhu, H.-J. (2015). Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. *Australasian Plant Pathology*, 44, 167-173. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13313-014-0334-3>
23. Verma, N., Ram, R., & Zaidi, A. A. (2005). In vitro production of Prunus necrotic ringspot virus-free begonias through chemo- and thermotherapy. *Scientia Horticulturae*, 103(2), 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.05.005>
24. Paprštejn, F., Sedlák, J., Svobodová, L., Polák, J., & Gadiou, S. (2013). Results of in vitro chemotherapy of apple cv. Fragrance – Short communication. *Horticultural Science (Prague)*, 40(4), 186-190. <https://hortsci.agriculturejournals.cz/artkey/hor-201304-0008>
25. Kabyzbekova, B., Nurseitova, T., Yussupova, Z., Turdiyev, T., Kovalchuk, I., Dolgikh, S., Soltanbekov, S., Seisenova, A., & Madenova, A. (2025). Application of in vitro techniques for elimination of Plum pox virus (PPV) and Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) in stone fruits. *Horticulturae*, 11(6), 633. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060633>
26. Paunovic, S., Ruzic, D., Vujovic, T., Milenkovic, S., & Jevremovic, D. (2007). In vitro production of Plum pox virus-free plums by chemotherapy with ribavirin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 21, 417-421. <https://doi.org/10.1080/13102818.2007.10817486>

Information about the authors

M.A. Askarova – corresponding author, PhD student, Department of Biotechnology, JSC "Almaty Technological University"; Senior Researcher, Department of Plant Protection, LLP Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute, Almaty, Kazakhstan; e-mail: molya.09.09.95@mail.ru;

Z.Ya. Yussupova – Master of Agricultural Sciences, Researcher, "In Vitro Gene Pool" Laboratory, LLP "Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute", Almaty, Kazakhstan; e-mail: zarina19851005@mail.ru;

T.N. Nurseitova – Sciences, Researcher, "In Vitro Gene Pool" Laboratory, LLP "Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute", Almaty, Kazakhstan; e-mail: n.toigul_90@mail.ru;

R.A. Abdikarimova – Master of Agricultural Sciences, Junior Researcher, "In Vitro Gene Pool" Laboratory, LLP "Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute", Almaty, Kazakhstan; e-mail: Raigul-95@mail.ru;

M.Zh. Sarshayeva – Master of Natural Sciences, researcher of the LLP "Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute", Almaty, Kazakhstan; e-mail: moka-1993@mail.ru;

B.Zh. Kabyzbekova – PhD, Head of the "In Vitro Gene Pool" Laboratory, LLP "Kazakh Fruit and Vegetable Research Institute", Almaty, Kazakhstan; e-mail: k_b_zh@mail.ru.