УДК 632.3

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269

МЕТОДЫ И ПОДХОДЫ К ЭЛИМИНАЦИИ ВИРУСОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Карпушина Марина Владимировна
канд. с.-х. наук
старший научный сотрудник
лаборатории питомниководства

Супрун Иван Иванович
канд. биол. наук
врио директора

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия», Краснодар, Россия

Одной из главных проблем плодоводства и ягодоводства в настоящее время является группа системных патогенов, для которых не существует эффективных средств защиты. Вирусы, вироиды, фитоплазмы и бактериальные патогены наносят производителям плодовой продукции огромный ущерб. Их наличие в растениях снижает урожайность и качество сельскохозяйственных культур. Распространённость вирусных болезней в условиях России варьирует от 32 до 80 % в зависимости от культуры и региона возделывания. Однако замены заражённого растительного материала на безвирусный позволяет увеличить урожайность насаждений до 30 %. Для производства безвирусного посадочного материала в мировой практике применяются различные методы по элиминации вирусов, такие как культура меристем (*in vitro*), термотерапия, химиотерапия, Микротрансплантация (микропривика) и криотерапия кончиков меристем.

UDC 632.3

DOI 10.30679/2219-5335-2020-3-63-254-269

METHODS AND APPROACHES TO VIRUS ELIMINATION UNDER *IN VITRO* AND *IN VIVO* CONDITIONS

Karpushina Marina Vladimirovna
Cand. Agr. Sci.
Senior Research Associate
Laboratory of Nursery

Suprun Ivan Ivanovich
Cand. Biol. Sci.
Temporarily Executive Director

Federal State Budget Scientific Institution «North Caucasian Regional Research Institute of Horticulture, Viticulture, Wine-making», Krasnodar, Russia

One of the main problems of the fruit and berry industry currently is a group of systemic pathogens for which there are no effective remedies of protection. Viruses, viroids, phytoplasmas and bacterial pathogens cause huge damage to fruit producers. Their presence in plants reduces the yield and quality of agricultural crops. The prevalence of viral diseases in Russia varies from 32 to 80 % depending on the culture and region of cultivation. However, replacing the infected plant material with a non-viral one can increase productivity by up to 30%. For the production of virus-free planting material in the world, various methods for the elimination of viruses are used, including such as the culture of meristem (*in vitro*), thermotherapy, chemotherapy, micro grafting (microtransplantation) and cryotherapy

Данные методы и подходы по элиминации вирусов успешно применяются в различных странах для эффективной борьбы с вирусами практически для всех наиболее экономически важных культур, что является сельскохозяйственной стратегией для производства безвирусного растительного материала. Основные факторы, влияющие на эффективность элиминации вирусов из растительного материала: тип вируса, вид растения и его генотип, температура и продолжительность термотерапии, пошаговое повышение температуры и её изменение, тип и концентрация антивирусных агентов, источник эксплантa, размер и месторасположение кончика меристем, генетической стабильность растения. В статье проанализированы данные литературных источников по вопросу элиминации вирусов из растительного материала различных плодовых культур. Показано, что комбинация методов элиминации вирусов имеет гораздо более высокую эффективность при сочетании не одного, а нескольких способов лечения поочерёдно, в зависимости от типа вируса, вида и сорта культуры.

Ключевые слова: ПЛОДОВЫЕ КУЛЬТУРЫ, ВИРУСЫ, ЭЛИМИНАЦИЯ, *IN VITRO*, *IN VIVO*, КУЛЬТУРА МЕРИСТЕМ, ТЕРМОТЕРАПИЯ, МИКРОПРИВИВКА, КРИОТЕРАПИЯ

of the meristem tips. These methods and approaches for the elimination of viruses are successfully used in various countries to effective viruses fight for almost all of the most economical important crops, which is an agricultural strategy for the production of virus-free plant material. The main factors affecting the efficiency of viruses elimination from plant material are as follows: type of virus, type of plant and its genotype, temperature and duration of thermotherapy, incremental temperature increase and its change, type and concentration of antiviral agents, explant source, tip size and the location of the meristem, genetic stability of the plant. The analyzed literature data on the elimination of viruses from plant material of various fruit crops show that the combination of methods for eliminating viruses has much higher efficiency when combining not only one, but several methods of plant healthing in turn, depending on the type of virus, type and variety of the crops.

Key words: FRUIT CROPS, VIRUSES, ELIMINATION, *IN VITRO*, *IN VIVO*, MERISTEM CULTURE, THERMOTHERAPY, MICRO GRAFTING, CRYOTHERAPY.

Введение. Производство безвирусного посадочного материала в настоящее время является одним из основных способов борьбы с вирусными заболеваниями плодов-ягодных культур во многих странах мира (Китай, США, Индия, Израиль), а также является необходимым элементом для возможности обмена селекционным материалом между регионами и странами [1, 2, 3]. Вирусные заболевания вызывают большие потери урожая и являются одной из проблем устойчивого развития сельскохозяйственного производства.

Распространённость вирусных заболеваний в условиях России варьирует от 32 до 80 % в зависимости от культуры и региона. Быстрое распространение вирусных заболеваний связано с лёгкостью заражения ими. Поскольку вирусы растений являются внутриклеточными паразитами, они легко передаются из поколения в поколение путём вегетативного размножения в полевых условиях, либо переносом вируса насекомыми от заражённого растения к здоровому, а также из-за ввоза некачественного посадочного материала из за рубежа.

Заражение патогенными микроорганизмами/вирусами не всегда приводит к гибели растения, поскольку многие из вирусов могут не проявлять видимых симптомов, но присутствие вируса в растении, снижает урожайность и качество сельскохозяйственных культур. Однако, по данным многих исследователей, замена заражённого растительного материала на безвирусный позволяет увеличить урожайность культур до 30 % [1-4]. В связи с этим вопросы по элиминации вирусов из растительного материала и борьба с вирусными заболеваниями в настоящее время являются актуальными [1, 2, 5, 6].

Цель работы заключается в анализе отечественных и зарубежных литературных источников по вопросу применения различных методов и подходов по элиминации вирусов из растительного материала плодово-ягодных культур в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Обсуждение. В настоящее время в мировой практике по производству безвирусного растительного материала разработаны различные методы элиминации вирусов, включающие такие, как культура меристем (*in vitro*), термотерапия, химиотерапия, микротрансплантация (микропривика) и криотерапия кончиков меристем. Подходы к элиминации вирусов, основанные на сочетании этих методов, успешно применяются для эффективного уничтожения различных вирусов практически из всех наиболее экономически важных сельскохозяйственных культур [1, 2, 6, 7].

По мнению Национального Сообщества чистых растений (США, National Clean Plant Network) и ряда других исследователей, методы *in vitro* представляют собой наиболее успешный подход к ликвидации вирусов из растительного материала. Общий успех оздоровления с помощью культуры меристем часто превышает 85 %, но зависит от вида культур, сорта и типа вируса [8].

Причины успеха оздоровления растений методом культуры меристем заключается в следующем: (1) поскольку перемещение вируса легко происходит в растении через сосудистую систему, которая отсутствует в апикальной меристеме, то движение вируса от клетки к клетке в апикальной меристеме происходит медленнее, чем активный рост самой меристемы, таким образом апикальная меристема остается наиболее чистой; (2) высокая метаболическая активность в активно делящихся клетках апикальной меристемы не позволяет репликации вируса; (3) «системы, инактивирующие вирусы» в растении, имеют более высокую активность в апикальной меристеме, чем в любой другой части растения, таким образом, меристема наиболее защищена от вирусов; (4) высокий уровень эндогенного ауксина в верхушках побегов способен ингибировать размножение вируса [7, 8, 9].

Несмотря на многие преимущества культура меристем подходит не для всех культур, поскольку некоторые вирусы наиболее трудно поддаются этому методу элиминации. В связи с этим культура меристем эффективно применяется многими исследователями в комбинации с термотерапией.

В методах, основанных на термотерапии, применённых исследователями в ряде стран, – Hu G-J (Китай), Sharma S. (Индия), Vivek V. (Индия), заражённые растения подвергались термообработке при температуре +38 … +52 ºС в течение нескольких минут и до нескольких недель. В таких условиях многие вирусы в тканях растений частично или полностью инактивируются с незначительным повреждением ткани самого растения. Выбор режима термотерапии должен позволить обрабатываемому растению выжить

и инактивировать жизнеспособность вируса. Учёными установлено, что термическая обработка предотвращает движение вируса к меристематическим клеткам побега, что приводит к росту более крупных побегов, свободных от вирусов [10-12]. Одним из важных условий термотерапии является поддержание оптимальной влажности воздуха и освещённости растений, с достаточным поступлением питательных веществ.

Однако у термотерапии имеется ряд недостатков, который заключается в том, что не все вирусы чувствительны к оздоровлению данным способом. Только изометрические и нитевидные вирусы устраняются с помощью термотерапии; кроме этого, длительная термообработка инактивирует систему устойчивости растения, провоцируя низкую выживаемость самого растения.

По данным многих литературных источников, сочетание термотерапии с последующим культивированием меристем, является наиболее часто используемым методом по элиминации вирусов из заражённых растений. Так, в исследованиях Skiada [13], сообщается о сочетании термотерапии с культурой меристем для элиминации листового вируса виноградной лозы (GLRaV-1) (легкий для элиминации), и стеблевого вируса виноградной лозы Rupestris (GRSPaV) (трудный для искоренения вирус).

Побеги виноградной лозы, зараженные GLRaV-1 и GRSPaV, подвергались тепловой обработке в течение 6 недель при чередующейся температуре 40 ºC / 37 ºC (день / ночь) с последующим культивированием меристем *in vitro*. Эта процедура привела к 53 % выживаемости термообработанных побегов, 56 % регенерации кончиков побегов, и 91 % и 74 % растений не имели GLRaV-1 и GRSPaV-1, соответственно.

Метод термотерапии с последующим выращиванием культуры меристем – наиболее часто используемый метод по элиминации вирусов из плодовых культур. Некоторые примеры успешного ликвидирования вирусов при помощи термотерапии с последующим культивированием меристем приведены в таблице 1 [10, 12, 14].

Таблица 1 – Примеры успешной элиминации вирусов
с помощью термотерапии и с последующим культивированием меристем

Вид/сорт	Вирусы	Температура и продолжительность	Выживание побегов после термотерапии (%)	Размер кончиков меристем (мм)	Выживание (%)	Частота без вирусов (%)
Яблоня Айдаред Чемпион	ACLSV ASPV (Айдаред) ACLSV, ASPV ASGV (Чемпион)	39°C, 6 дней	Нет данных	1,0-2,0	63 Айдаред 44 Чемпион	60 Айдаред 0 Чемпион
Яблоня Yantu 9 Xinyantu 3 Xin 2001 Гала	ACLSV, ASGV, ASPV ApMV	38 °C, 30 дней	Нет данных	1,0	26 в общем	43 в общем
Яблоня Гала, Фуджи, М9 подвой	ASGV	36 °C/32 °C, (день/ ночь), 4 недели	100	1,5	63–90	7–38
Яблоня Оригон Спур II	ACLSV, ApMV, ASGV, ASPV	37-40 °C, 4 недели	Нет данных	0,3-0,6	26–33	75 (ACLSV) 100 (ApMV, ASGV и ASPV)
Груша Huang-hua	ASGV ACLSV	37 °C, 35 дней	64	1,0	-	66.7 (ACLSV) 33.3 (ASGV)
Слива Early blue	PNRSV	35-38 °C, 10-12 дней	14–71	5,0	-	100
Малина Gatineau	RBDV	37 °C, 21 дней	Нет данных	0,2-0,3	Нет данных	39

Метод химиотерапии, применяемый в ряде исследований по элиминации вирусов, основан на использовании антивирусных химических агентов (актиномицин D, рибавирин, 2-тиоурацил, циклогексан и т. д), добавляемых в питательную среду в различных концентрациях, в которой в последующем проращиваются зараженные побеги в культуре *in vitro*. Принцип метода заключается в способности антивирусных агентов ингибировать синтез вирусной РНК и препятствовать его дальнейшей репликации [15-18].

По данным Hu G, Dong Y., сочетание химиотерапии с термотерапией (табл. 2) способно элиминировать вирусы (ACLSV, ASPV, ASGV) из яблони в пораженных побегах *in vitro* [16].

Таблица 2 – Примеры химиотерапии *in vitro* с последующей термотерапией для ликвидации вирусов [15-18]

Вид	Вирусы	Противовирусные химические вещества (мг / л)	Выживание обработанных побегов (%)	Выживание кончиков побегов (%)	Частота без вирусов (%)	Страна
Яблоня Груша Малина	ACLSV и ASGV яблоня, ACLSV в груше и малине, RVCV в малине	Рибавирин (50) (Виразол)	42 яблоня, 80 груша 34 малина	нет данных	100 (ACLSV и ASGV в яблоне), 83 (ACLSV в груше), 89 (RVCV в малине)	Мексика
Яблоня	ASPV, ASGV и ACLSV	Рибавирин (25)	90	59 апикальная меристема и 100 пазушные почки	94 апикальные 100 пазушные	Китай
Груша	ACLSV	Рибавирин (50)	71	Нет данных	90	США
Груша	ASGV, ACLSV	Рибавирин (25)	100	71	100	Греция

Инфицированные вирусом побеги яблони культивировали в условиях *in vitro* на среде MS, дополненной 25 мкг/мл рибавирина (после автоклавирования). Затем подросшие побеги подвергали термообработке при постоянной температуре 36 ºС. После 20 дней термотерапии из пазушных побегов

извлекали кончики меристем (размером 1,0 мм) и культивировали до регенерации побегов. Около 90 % обработанных побегов выжило. Все кончики меристем регенерировали в побеги, и регенерированные побеги были свободны от вируса хлоротической кольцевой пятнистости листьев яблони (ACLSV), вируса ямчатости древесины яблони (ASPV) и вируса бороздчатости древесины яблони (ASGV).

Элиминация вирусов методом микропрививки включает в себя размещение эксплантата меристемы или кончика побега ценного растения на подвой, выращенный в асептических условиях из семян, или на микроподвой, размноженный в культуре *in vitro* [11, 19-22]. Микропрививка также используется для прогнозирования несовместимости прививок, гистологических исследований, индексации болезней, производства безвирусных растений, особенно устойчивых к почвенным патогенам, и размножения труднодоступных растений.

Sharma S., Singh B. и др. [11] сообщают о сочетании термотерапии с микропрививкой для эффективного устранения вируса индийской цитрусовой кольцевой пятнистости (ICRSV) из больных растений Kinnow (Citrus nobilis × Citrus deliciosa).

В данном исследовании однолетние горшечные растения подвергались воздействию температуры 38- 40 ºС путём постепенного повышения температуры (1 ºС/день) с 30 ºС до 38-40 º С в течение 9-11 дней, с последующим поддержанием температуры на уровне 38-40 ºС до момента, пока новые побеги не подрастут. Затем кончики меристем (0,7 мм) иссекали с новых побегов, дезинфицировали поверхность и проводили микропрививки на двухнедельные проросты лимона *in vitro* (C. jambhiri). Микротрансплантаты развивались в ростки через 5-6 недель после пересадки. Успешность микропрививки состаила 28-40 %, и 59-60 % из привитых растений оказались свободны от ICRSV.

В исследованиях, проведённых китайскими учёными Hu G.-J, Dong Y-F., Zhang Z.-P., продемонстрирована элиминация вирусов ACLSV, ApNMV, ASPV, ASGV из трёх сортов яблони (XF, LK и XJ) с помощью термотерапии в сочетании с микропрививкой кончиков меристем, со средним значением успешности элиминации 89,5 %. Данное исследование также выявило, что термотерапия может привести к неполному уничтожению вируса, и то, что вирусы разных видов имеют различную толерантность к высоким температурам. Эффективность элиминации четырёх вирусов была в следующей последовательности: наибольшая у вируса ACLSV (хлоритическая пятнистость листьев яблони)> ApNMV (вирус никротической мазаики) > ASPV (вирус ямчатости древесины (стебля) яблони) > ASGV (вирус бороздчатости древесины (стебля) яблони) [19].

Одним из новых направлений по элиминации вирусов является метод криотерапии или криоконсервации растений, который позволяет ликвидировать патогенные микроорганизмы с высокой частотой, путём краткой обработки кончиков меристем в жидком азоте (-196 ºС).

Методы на основе криотерапии просты в реализации и не требуют специального оборудования в дополнение к тем, которые обычно доступны в лабораториях культуры меристем. Данный способ можно легко протестировать на различных видах растений и сортах, для которых доступны криогенные процессы.

Данный метод основан на том, что здоровые растения регенерируют из оставшейся без патогенов меристематической ткани. Метод облегчает обработку большого количества образцов и не зависит от размера кончика побега [22-24]. По мнению китайских исследователей (Wang Q-C, Li B-Q, Wang MR), у этого метода есть потенциал, чтобы заменить более традиционные методы, как культуру меристем [25-29].

В настоящее время известно два эффективных метода криотерапии – инкапсуляция-дегидратация и капельная витрификация, описанные китайскими исследователями Wang Q-C и Li et [28, 29]. Согласно методике, процесс инкапсуляции-дегидратаци состоит из следующих последовательных этапов: кончики инфекционных побегов суспензируют в растворе альгината натрия; смесь раствора альгината натрия с наконечниками побегов по каплям стерильной пипеткой (1 мл) помещают в раствор $CaCl_2$ и выдерживают в течение 20 минут для образования «шариков», каждый диаметром 4-5 мм и содержащих один наконечник побега.

Затем шарики извлекают щипцами из раствора $CaCl_2$ и сушат на поверхности стерилизованной фильтровальной бумаги в течение нескольких секунд. Шарики культивируют на питательной среде в течение 7 дней. Затем шарики переносят на стерильные чашки Петри, по 20 шариков на каждую. Шарики сушат в ламинарном шкафу, чтобы снизить содержание влаги примерно до 20 %. В конце дегидратации шарики переносят в криотрубки (десять шариков на криотрубку) и погружают непосредственно в жидкий азот на 30 мин. Криотрубки вынимают из жидкого азота и помещают в водяную баню с температурой 38 ºС на 2 мин.

Оттаявшие шарики после процесса капсулирования-дегидратации и кончики меристем после капельной витрификации культивируют на питательной среде для восстановления при 24 ± 2 ºС в темных условиях. Образцы переносят на свежую питательную среду каждые 16-24 часов три раза, чтобы уменьшить реакцию «потемнения».

После трёх дней культивирования в темноте образцы переносят в более светлые условия для восстановления побегов. Побеги размером менее 5,0 мм восстанавливаются примерно через 8 недель. Далее побеги культивируют на питательной среде до тех пор, пока не произойдет рост побегов до размера не менее 2,0 см. Затем побеги (≥2,0 см) переносят в новую питательную среду и

культивируют в условиях освещения. После 4 недель укоренения образуются побеги с хорошо развитыми корнями (рис. 1). Укоренённые побеги переносят в 30-сантиметровые горшки, содержащие торф, которые в дальнейшем выращивают в парниковых условиях в течение 16-часового фотопериода и при 24-20 ºС дневных / ночных температурах. Растения орошают и удобряют согласно практическим рекомендациям. После 10 месяцев роста растений в почве отбираются пробы, которые используются для обнаружения вирусов методом ОТ-ПЦР [28].

Рис. 1 Обнажённый 0,1 мм кончик побега (1) и инкапсулированная меристема (2) *Eucalyptus* spp. для криотерапии методом инкапсуляции-дегидратации; стадии отрастания через 4 недели (3) и 6 недель (4) инкапсулированных меристем замороженных видов эвкалипта

Метод капельной витрификации, основан на химической витрификации и одностадийной замораживающей обработке. В этом методе экспланты 0,1-0,3 мм обрабатывают раствором криопротектора (обычно PVS2), путём помещения их по отдельности в капли раствора криопротектора объёмом 3-10 мкл (в зависимости от размера эксплантата), находящиеся на полосках алюминиевой фольги, которая затем погружается в жидкий азот.

Для согревания алюминиевую фольгу непосредственно погружают в жидкую среду с добавлением сахарозы, а после 20 мин разгрузки кончики побегов переносят на питательную среду для прорастания (рис. 2).

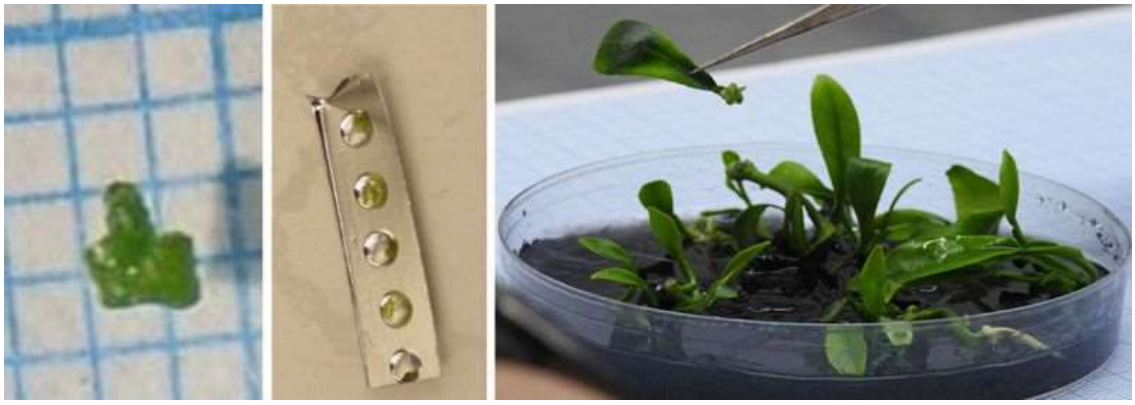

Рис. 2 Обработка образцов раствором криопротектора
и их размещение на полосе алюминиевой фольги
с последующим переносом на среду для возобновления роста

Основным преимуществом этого метода является возможность достижения очень высоких скоростей охлаждения / нагревания из-за очень малого объема раствора криопротектора, в который помещаются экспланты.

Несмотря на то, что это новая методика, имеется много данных о получении эксплантов с высоким процентом прорастания после погружения их в жидкий азот, однако вирусы, которые легко перемещаются из клетки в клетку, могут быть более устойчивы к элиминации. Например, в исследованиях Wang O-C, для устранения вируса карликовости малины (*Rubus* spp.) была необходима комбинация методов лечения, либо многократные повторности. Так, криотерапия кончиков побегов не смогла полностью уничтожить вирус карликовости малины (RBDV) [26] и вирус бороздчатости яблони (ASGV) [27], в то время как комбинация термотерапии с криотерапией кончиков побегов позволила получить 33 % и 100 % растений, свободных от RBDV и ASGV, соответственно.

Wang M.-R, Zhang Z. и ряд других китайских исследователей считают, что элиминация вирусов методом криотерапии облегчает обработку большого количества образцов и дает высокий процент безвирусных растений, избегая трудности, связанные с выделением очень маленьких меристем. На

сегодняшний день криотерапия кончиков побегов успешно применяется для уничтожения вирусов, фитоплазм и бактериальных патогенов из сельскохозяйственных растений во многих странах мира. (табл. 3).

Таблица 3 – Различные методы криотерапии для устранения патогенов из вегетативно размножаемых и экономически важных сельскохозяйственных культур [26, 27]

Культура	Метод криотерапии	Искорененный патоген	Страна
Яблоня	Капсулированная витрификация	ASPV	Китай
Яблоня	Капельная витрификация	ACLSV, ASPV, ASGV, ApMV	Казахстан
Слива гибрид	Капельная витрификация	PPV	Франция
Абрикос	Капельная витрификация	PPV	Турция
Малина	Термотерапия + капсулированная витрификация	RBDV	Китай
Банан	Капельная витрификация	CMV, BSV	Бельгия
Цитрусовые	Капельная витрификация	HLB	Китай

Заключение. Основываясь на вышеизложенном, можно сделать вывод, что основные факторы, влияющие на эффективность элиминации вирусов, заключаются в следующих элементах: тип вируса, вид растения и его генотип, температура и продолжительность термотерапии, пошаговое повышение температуры и её изменение в течение термотерапии, тип и концентрация антивирусного агента, размер кончика меристемы и его месторасположение, источник эксплантa, генетическая стабильность растения. Проанализированные данные показывают, что комбинация методов элиминации вирусов имеет гораздо более высокую эффективность при сочетании не одного, а нескольких способов оздоровления поочерёдно, в зависимости от типа вируса, вида и сорта культуры.

Литература

1. Куликов И.М., Упадышев М.Т. Пути оздоровления садовых культур от вирусов. Защита и карантин растений. 2015. № 7. С.10-12. ISSN: 1026-8634.

2. Коваленко Н.Н., Подорожный В.Н. Совершенствование системы получения оздоровленного посадочного материала косточковых плодовых культур в Краснодарском крае // Научные труды СКФНЦСВВ. Т 25. Краснодар: СКФНЦСВВ, 2019. С. 92-96.

3. Barba M, Ilardi 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.

4. Laimer M, Barba M. Elimination of systemic pathogens by thermotherapy, tissue culture, or in vitro micrografting. In: Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann M, editors. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. St. Paul: American Phytopathological Society; 2011. p. 389–93.

5. Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Câmara Machado A, Weiss B, Wang Q, Katinger H, Laimer M. New aspects of virus elimination in fruit trees. Acta Hortic. 1995; 386:409–18.

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

7. Zuļģe N, Kâle A, Gospodaryk A, 5. Postman JD, Sugar D. Elimination of viruses from the USDA Pyrus germplasm collection. Acta Hortic. 2002; 596:529–30

8. Электронный ресурс http://nationalcleanplantnetwork.org/Virus_elimination_therapy/

9. Vēvere K, Moročko-Bičevska I. Establishment of nuclear stock collections for apple and pear in Latvia. Proc Latv Acad Sci Sect B. 2017; 71:156–65.

10. Hu G-J, Zhang Z-P, Dong Y-F, Fan X-D, Ren F, Zhu H-J. Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. Australas Plant Pathol. 2015; 44:167–73.

11. Sharma S, Singh B, Rani G, Zaidi AA, Hallan VK, Nagpal AK, Virk GS. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2008;92:85–92.

12. Vivek M, Modgil M. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar ‘Oregon Spur-II’. Virus Dis. 2018; 29: 75–82.

13. Skiada FG, Grigoriadou K, Maliogka VI, Katis NI, Eleftheriou EP. 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. J Plant Pathol. 2009; 91:177–84.

14. Cheong EJ, Jeon AR, Kang JW, Mock R, Kinard G, Li R. *In vitro* elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (Rubus occidentalis). Hortic Sci (Prague). 2014; 2: 95–9.

15. Singh B. Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. J Crop Sci Biotechnol. 2015;18:341–8.

16. Cieślińska M. Elimination of Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) from pear by *in vitro* thermotherapy and chemotherapy. Acta Hortic. 2002; 596:481–4.

17. Hu G, Dong Y, Zhang Z, Fan X, Ren F, Zhou J. Virus elimination from *in vitro* apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2015;121:435–43.

18. Paprštein F, Sedlák J, Svobodová L, Polák J, Gadiou S. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance. Hortic Sci (Prague). 2013; 40:186–90.

19. Hu G-J, Dong Y-F, Zhang Z-P, Fan X-D, Ren F, Li Z-N. Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with in vivo shoot-tip grafting and *in vitro* meristem culture. J Phytopathol. 2017;165:701–6.

20. Faccioli G, Marani F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganzawa H, editors. Plant virus disease control. St. Paul: APS Press; 1998. p. 346–80.

21. Chae CW, Yun SH, Park JH, Hyun JW, Koh SW, Lee DH. Micrografting and heat treatment combination for eliminating virus of CTV-infected Citrus. J Life Sci. 2013; 23: 267–72.

22. Wang Q-C, Panis B, Engelmann F, Lambardi M, Valkonen JPT. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. Ann Appl Biol. 2009;154:351-63.

23. Wang MR., Chen L., Zhang Z., Blystad DR., Wang QC. (2018) Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY.

24. Kaya E., Galatali S., Guldag S., Celik O. (2020) A New Perspective on Cryotherapy: Pathogen Elimination Using Plant Shoot Apical Meristem via Cryogenic Techniques. In: Naseem M., Dandekar T. (eds) Plant Stem Cells. Methods in Molecular Biology, vol. 2094. Humana, New York, NY.

25. Wang QC, Valkonen JPT. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trend Plant Sci. 2009; 14:119–22.

26. Wang QC, Cuellar WJ, Rajamaki M-L, Hirata Y, Valkonen JPT. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Mol Plant Pathol. 2008; 9: 237–50.

27. Zhao L, Wang M-R, Cui Z-H, Chen L, Wang Q-C. Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of Apple stem grooving virus (ASGV) from infected apple in vitro shoots. Plant Dis. 2018; 102:1574–80.

28. Wang QC, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (Rubus idaeus L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep. 2005;24:280–8.

29. Li B-Q, Feng C-H, Hu L-Y, Wang M-R, Wang Q-C. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of Apple stem pitting virus (ASPV) and Apple stem grooving virus (ASGV) from apple rootstocks ‘M9’ and ‘M26’. Ann Appl Biol. 2016;168:1 42–50.

References

1. Kulikov I.M., Upadyshev M.T. Puti ozdorovleniya sadovyh kul'tur ot virusov. Zashchita i karantin rastenij. 2015. №7. S.10-12. ISSN: 1026-8634.

2. Kovalenko N.N., Podorozhnyj V.N. Sovershenstvovanie sistemy polucheniya ozdorovlennogo posadochnogo materiala kostochkovyh plodovyh kul'tur v Krasnodarskom krae // Nauchnye trudy SKFNCSVV. T 25. Krasnodar: SKFNCSVV, 2019. S. 92-96.

3. Barba M, Ilardi 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.

4. Laimer M, Barba M. Elimination of systemic pathogens by thermotherapy, tissue culture, or *in vitro* micrografting. In: Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann M, editors. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. St. Paul: American Phytopathological Society; 2011. p. 389–93.

5. Knapp E, Hanzer V, Weiss H, da Câmara Machado A, Weiss B, Wang Q, Katinger H, Laimer M. New aspects of virus elimination in fruit trees. Acta Hortic. 1995; 386:409–18.

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

7. Zuļģe N, Kâle A, Gospodaryk A, 5. Postman JD, Sugar D. Elimination of viruses from the USDA Pyrus germplasm collection. Acta Hortic. 2002; 596:529–30

8. Elektronnyj resurs http://nationalcleanplantnetwork.org/Virus_elimination_therapy/

9. Vēvere K, Moročko-Bičevska I. Establishment of nuclear stock collections for apple and pear in Latvia. Proc Latv Acad Sci Sect B. 2017; 71:156–65.

10. Hu G-J, Zhang Z-P, Dong Y-F, Fan X-D, Ren F, Zhu H-J. Efficiency of virus elimination from potted apple plants by thermotherapy coupled with shoot-tip grafting. Australas Plant Pathol. 2015; 44:167–73.

11. Sharma S, Singh B, Rani G, Zaidi AA, Hallan VK, Nagpal AK, Virk GS. *In vitro* production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV) free Kinnow plants employing thermotherapy coupled with shoot tip grafting. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2008;92:85–92.

12. Vivek M, Modgil M. Elimination of viruses through thermotherapy and meristem culture in apple cultivar ‘Oregon Spur-II’. Virus Dis. 2018; 29: 75–82.

13. Skiada FG, Grigoriadou K, Maliogka VI, Katis NI, Eleftheriou EP. 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. J Plant Pathol. 2009; 91:177–84.

14. Cheong EJ, Jeon AR, Kang JW, Mock R, Kinard G, Li R. *In vitro* elimination of Black raspberry necrosis virus from black raspberry (Rubus occidentalis). Hortic Sci (Prague). 2014; 2: 95–9.

15. Singh B. Effect of antiviral chemicals on in vitro regeneration response and production of PLRV-free plants of potato. J Crop Sci Biotechnol. 2015;18:341–8.

16. Cieślińska M. Elimination of Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV) from pear by in vitro thermotherapy and chemotherapy. Acta Hortic. 2002; 596:481–4.

17. Hu G, Dong Y, Zhang Z, Fan X, Ren F, Zhou J. Virus elimination from in vitro apple by thermotherapy combined with chemotherapy. Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2015;121:435–43.

18. Paprštein F, Sedlák J, Svobodová L, Polák J, Gadiou S. Results of in vitro chemotherapy of apple cv. Fragrance. Hortic Sci (Prague). 2013; 40:186–90.

19. Hu G-J, Dong Y-F, Zhang Z-P, Fan X-D, Ren F, Li Z-N. Efficacy of virus elimination from apple by thermotherapy coupled with in vivo shoot-tip grafting and *in vitro* meristem culture. J Phytopathol. 2017;165:701–6.

20. Faccioli G, Marani F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A, Khetarpal RK, Koganzawa H, editors. Plant virus disease control. St. Paul: APS Press; 1998. p. 346–80.

21. Chae CW, Yun SH, Park JH, Hyun JW, Koh SW, Lee DH. Micrografting and heat treatment combination for eliminating virus of CTV-infected Citrus. J Life Sci. 2013;23: 267–72.

22. Wang Q-C, Panis B, Engelmann F, Lambardi M, Valkonen JPT. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. Ann Appl Biol. 2009;154:351–63.

23. Wang MR., Chen L., Zhang Z., Blystad DR., Wang QC. (2018) Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY.

24. Kaya E., Galatali S., Guldag S., Celik O. (2020) A New Perspective on Cryotherapy: Pathogen Elimination Using Plant Shoot Apical Meristem via Cryogenic Techniques. In: Naseem M., Dandekar T. (eds) Plant Stem Cells. Methods in Molecular Biology, vol. 2094. Humana, New York, NY.

25. Wang QC, Valkonen JPT. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trend Plant Sci. 2009; 14:119–22.

26. Wang QC, Cuellar WJ, Rajamaki M-L, Hirata Y, Valkonen JPT. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. Mol Plant Pathol. 2008;9: 237–50.

27. Zhao L, Wang M-R, Cui Z-H, Chen L, Wang Q-C. Combining thermotherapy with cryotherapy for efficient eradication of Apple stem grooving virus (ASGV) from infected apple in vitro shoots. Plant Dis. 2018; 102:1574–80.

28. Wang QC, Laamanen J, Uosukainen M, Valkonen JPT. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of raspberry (Rubus idaeus L.) by encapsulation-vitrification and encapsulation-dehydration. Plant Cell Rep. 2005;24:280–8.

29. Li B-Q, Feng C-H, Hu L-Y, Wang M-R, Wang Q-C. Shoot tip culture and cryopreservation for eradication of Apple stem pitting virus (ASPV) and Apple stem grooving virus (ASGV) from apple rootstocks ‘M9’ and ‘M26’. Ann Appl Biol. 2016;168:1 42–50.