

Н.В. Ромаданова*, С.В. Кушнаренко

Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, Алматы, Казахстан

*Автор для корреспонденции: nata_romadanova@mail.ru

Биотехнология получения безвирусных саженцев яблони

В обзорной статье подробно изложены последовательные этапы работы по получению оздоровленных саженцев яблони биотехнологическими методами. Представлены оптимизированные составы питательных сред для всех этапов криоконсервации (криотерапии), хемотерапии, идентификации вирусов, рекомендованы приемы введения в культуру *in vitro*, микроклонального размножения, укоренения в культуре *in vitro* и адаптации растительного материала к почвенному субстрату. В результате биотехнологическими методами создана безвирусная *in vitro* коллекция *Malus domestica* Borkh. и *M. sieversii* Ledeb. M. Roem., которая сохраняется при температурах (+23–25 °С) и (+ 4 °С). Криоконсервация апикальных меристем стародавних и коммерчески ценных сортов, клоновых подвоев, а также дикорастущих форм яблони в жидком азоте при -196 °С позволит долгосрочно сохранять этот ценный растительный материал, и, при необходимости, созданная криоколлекция может быть использована в селекционном процессе. Безвирусные подвои и сорта яблони могут выступать субъектами агропромышленного комплекса в области садоводства посадочным материалом класса супер-элиты, что, в целом, будет способствовать развитию местного питомниководства.

Ключевые слова: *Malus*, коллекция *in vitro*, крио- и хемотерапия, криобанк, суперэлитные саженцы, сорта яблук, охрана леса.

Введение

Многообразие природных зон Казахстана обусловило богатство и разнообразие его биологических ресурсов, необходимых для экономического и социального развития. Биологическое разнообразие ресурсов являются национальным достоянием огромной ценности для нынешнего и будущего поколений. На сегодняшний день площади дикорастущих яблоневых лесов составляют менее 20 % от объема, занимаемого ими в 60-х гг. XX века. Это приводит к нарушению стабильности биосферы, утрате многих ценных, редких, реликтовых и особенно эндемичных видов растений и животных. Ухудшение состояния биоразнообразия связано с хозяйственной деятельностью человека, загрязнением окружающей среды, стихийными бедствиями, а также незначительной площадью охраняемых территорий. Сложная ситуация складывается также в вопросах обеспечения охраны лесов от пожаров и незаконных рубок в Государственном лесном фонде. В особенной зоне риска находятся редкие дикорастущие яблони, занесенные в Красную книгу Казахстана [1]. Исчезновению подвержены теперь и перспективные сорта, и клоновые подвои яблони, которые подверглись атаке бактериального ожога, в особенной опасности сорта местной селекции, саженцы которых не были широко распространены в мировых масштабах [2].

Яблоня (лат. *Malus*) — род листопадных деревьев и кустарников семейства Розоцветные (*Rosaceae*), насчитывает 62 вида (2013) [3]. Плоды яблони используются в питании и лечении от различных заболеваний. Хорошими качествами обладает древесина яблони, многие виды выращивают в качестве декоративных растений, кроме того, они используются в полезном лесоразведении. Все виды — хорошие медоносы.

Наиболее распространенными являются яблоня домашняя, или культурная (*Malus domestica*), — это большинство возделываемых в мире сортов; яблоня сливолистная, китайская (*Malus prunifolia*), и яблоня низкая (*Malus pumila*) [4]. Родиной яблони является территория современного Южного Казахстана и Киргизии (предгорья Алатау), где до сих пор встречается в диком виде яблоня Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.). Предположительно, из этого региона во времена Александра Македонского либо во время других миграций она была привезена в Европу и другие регионы. Также считается, что распространению диких плодов яблони Сиверса способствовал Великий Шелковый путь.

Яблоня Сиверса получила свое название в честь ботаника Иоганна Сиверса, который встретил яблоневый лес в долине реки Урджар в южной части горного хребта Тарбагатай. К яблоне Сиверса

близки два горных вида: яблоня киргизская (*Malus kirghisorum* Al.Fed. & Fed) и яблоня Недзвецкого (*Malus niedzwetzkyana* Dieck ex Koehne), которые, наряду с яблоней Сиверса, также встречаются в Казахстане, образуя заросли в горах. Яблоня Недзвецкого, красивейшая (кора ствола, ветвей, бутоны, молодые листья, цветы, плоды всё окрашено в малиново-пурпурный цвет разных оттенков) и редкая яблоня так же, как и яблоня Сиверса, внесена в Красную книгу Казахстана как исчезающий вид [1]. Большинство дикорастущих яблонь произрастает в Жонгар-Алатауском национальном природном парке. Сегодня на территории парка находится пять генетических резерватов (охраняемые природные зоны) яблони. Площадь зарослей дикой яблони в горах Алатау, где сосредоточены самые крупные в мире ресурсы дикорастущих яблонь, составляет около 11 тысяч га. Яблоневые леса Заилийского и Джунгарского Алатау признаны генетическим центром происхождения дикорастущих яблонь планеты. Эта гипотеза, высказанная академиком Николаем Вавиловым еще в конце 20-х годов прошлого века, подтверждена современными результатами исследований мирового научного сообщества [5–7].

Растущие на крутых склонах деревья диких яблонь порой достигают 30-метровой высоты, сохранились исполины, возраст которых 130 лет. Дикие яблони хорошо переносят перепады температуры от -40°C до $+40^{\circ}\text{C}$. Эти деревья выдержали самые разные природные катаклизмы, нашествия вредителей и могут помочь людям в селекционном процессе в совершенствовании существующих сортов [8]. В результате отбора яблонь человеком из всего многообразия возникающих естественных изменений сохранились и постепенно усиливались ценные свойства. Некоторые сорта народной селекции имеют промышленное значение и по сей день, они пока составляют основу ассортимента. Сортные яблони наиболее сильно отличаются от своих диких прородительниц по признакам, которые более всего интересовали человека: вкус, величина и внешний вид плодов, тогда как цветки и листья существенно не изменились.

Яблони разводят в большинстве областей с умеренным климатом. Главные, основные мировые производители плодов — это Германия, Италия, Франция, Испания, Китай, Япония, США, Канада, Аргентина, Чили, Австралия, Новая Зеландия и ЮАР [9]. В Казахстане в среднем урожайность яблони составляет в пределах 4 т/га, тогда как урожайность яблони во многих странах — 50–60 т/га. Основной проблемой низких урожаев является отсутствие интенсивных технологий оздоровления и выращивания посадочного подвойного и привойного материала. Яблоневые сады поражены бактериальными, грибными и вирусными заболеваниями [10].

Вирусы являются возбудителями многих опасных заболеваний яблони. Проявляются вирусные болезни в виде хлоротической или антоциановой окраски листьев, новообразованиями на отдельных органах и тканях, аномальным пробуждением почек, задержкой роста. Распространяются вирусные заболевания с соком инфицированных растений, особенно во время обрезки и прививки, пылью, семенами, насекомыми и почвенными нематодами [11]. Инфицированное дерево остается больным в течение всей своей жизни, соответственно вирусные заболевания плодовых имеют хронический характер. Использование черенков с таких деревьев для прививки приводит к производству посадочного материала, пораженного вирусами, а также одновременно стимулирует дальнейшее распространение вирусных болезней. Возбудители вирусных болезней снижают устойчивость растений к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, вызывают нарушения физиологических процессов и, как следствие, ухудшают вегетативную и генеративную продуктивность, укоренение, выход стандартных саженцев в маточниках, а также их приживаемость в питомнике [10–12]. Соответственно, вирусные болезни яблони широко распространены и наносят огромный экономический ущерб во всем мире, что обуславливает необходимость их раннего выявления [13, 14].

В публикации ученых из Научно-исследовательского института плодоводства и виноградарства говорится о том, что в плодовых насаждениях юга и юго-востока республики выявлено 7 вирусных заболеваний на яблоне, из которых наиболее опасными являются: хлоротическая пятнистость листьев яблони (*Apple chlorotic leafspot virus (ACLSV)*), вирус растрескивания ствола (*Apple stem pitting virus (ASPV)*) и вирус бороздчатости древесины (*Apple stem grooving virus (ASGV)*). Какие еще 4 вируса выявлены, не уточняется [12]. В других статьях казахстанских авторов, а также в публикациях исследователей смежных регионов, таких как Россия и Беларусь, среди вирусных заболеваний были выявлены только ACLSV, ASGV, ASPV [15–18]. Ученые Института биологии и биотехнологии растений (ИББР) в результате тестирования яблони обнаружили 4 вируса ACLSV, ASPV, ASGV и ApMV в различных сочетаниях [16, 19]. В последние годы в Казахстане также отмечено массовое распространение бактериального ожога, вызываемого бактерией (*Erwinia amylovora*), который приводит к гибели

урожая, а впоследствии и всего яблоневого сада [20]. Бактериальный ожог может привести к экологической катастрофе — в опасности окажутся парки и скверы городов, защитные лесополосы и т.п.

Природно-климатические условия юга и юго-востока Казахстана благоприятны для выращивания высококачественной яблоневой продукции, которая может быть использована в питании, служить сырьем для переработки в достаточных количествах для обеспечения внутреннего рынка и экспорта [10]. Тем не менее, в настоящее время в Казахстан значительная часть саженцев яблони завозится из зарубежных стран (более 55 %). Это связано с тем, что урожайность невысокая, саженцы местного производства низкого качества, плоды не выдерживают конкуренцию с зарубежной продукцией по товарным характеристикам [2, 10, 21].

На данный момент в Казахстане практически отсутствуют питомники, которые обеспечивают рынок отечественными оздоровленными саженцами. Высокий спрос оздоровленной продукции частично покрывается за счет импорта. В результате недостатки традиционных способов выращивания яблони обусловили необходимость разработки научных методов оздоровления генофонда, организации маточников с саженцами, размноженными в учреждениях, занимающихся производством оздоровленного посадочного материала. Биотехнологическими методами вегетативное *in vitro* потомство получают от единичного исходного растения, отобранного по сортовой (клоновой) типичности с гарантированной чистотой от различных инфекционных заболеваний [22, 23]. Для растений *in vitro* проводят подбор питательной среды, обеспечивающей высокий коэффициент размножения (КР) [11, 12, 24, 25]. Питательные среды оптимизируют эмпирическим способом и с использованием различных электронных программ, например, такой как *Designing expert systems* [26].

В лаборатории криосохранения гермоплазмы ИББР разработаны методы микроклонального размножения для многих плодовых и ягодных культур, в том числе для яблони [27–30]. Освобождение от бактериальной и грибной инфекции достигается на этапе введения растительного материала в культуру *in vitro*, однако оздоровить от вирусной инфекции такими способами практически невозможно. Известно несколько способов оздоровления пораженного вирусами растительного материала. Одним из методов является термотерапия [31, 32]. Методика заключается в суховоздушной обработке или в погружении растительного материала в горячую воду (38–55°C). Существуют различные гипотезы для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термообработки. Например, длительная высокая температура может вызвать разрушение всех накопленных в клетках вирусных частиц и полное освобождение от вирусов целого растения. Однако чаще освобождаются от инфекции лишь отдельные части или органы растений, например, апикальные меристемы. В оставшихся тканях уменьшается концентрация вирусных частиц, которые не успевают перемещаться в быстрорастущие ткани.

Многие ученые считают, что получить свободный от вирусов материал можно путем размножения верхушечными меристемами. Авторы объясняют это наличием в меристемах больших концентраций ауксинов, препятствующих размножению вирусных частиц, а также предполагают, что физиологически мембраны меристематических клеток препятствуют проникновению и размножению вирусов. Метод верхушечных меристем был описан Белкен-Грен и Миллером, которые освободили от термостабильного вируса А 50 % растений *Fragaria vesca* [33]. В дальнейшем, этот метод стал использоваться на разных культурах во многих странах мира [34, 35]. Однако впоследствии ученые показали наличие остаточной инфекции в пораженных вирусами культурах. Поэтому вирусологи начали применять для оздоровления растений термотерапию в сочетании с другими методами [14, 30, 34–38].

Параллельно с описанными выше способами борьбы с вирусами ученые стали применять хемотерапию *in vivo* и *in vitro*. Для чего в питательные среды стали добавлять различные противовирусные препараты. М.Т. Упадышев рекомендует различные органические кислоты, которые обеспечивают оздоровление растений от 80 до 100 %. Им же проведено оздоровление малины от вирусов при помощи добавления в питательную среду препаратов Рибавирин, Кагоцел и Арбидол [39]. Трудность при подборе таких веществ заключается в том, что противовирусный препарат должен блокировать процесс размножения вируса, не повреждая при этом само растение. Кроме того, противовирусный препарат должен сохранять активность в течение достаточно длительного времени, так как частое его применение может быть губительным для растения.

Оздоровление от вирусов можно добиться также с помощью криотерапии, растения, выращенные из меристем после криоконсервации, являются безвирусными [19, 40]. Этот метод заключается в погружении инфицированных апикальных меристем в жидкий азот на непродолжительное время (20–

60 мин), что приводит к разрушению клеток, в которых обычно расположены вирусы. В результате это позволяет получить высокую частоту свободных от патогенов жизнеспособных растений [19]. Для криотерапии различных культур используют разные методы криоконсервации, те, которые более результативны для того или иного объекта [41, 42]. Криотерапию успешно применяют для освобождения от вирусов у картофеля, сладкого картофеля, винограда, банана, апельсина, мандарина, помело, лимона, в том числе и яблони [19, 43–50].

Процесс оздоровления зависит от чувствительности растений к вирусам и от самого штамма вируса, так как процент освобождения от вирусов у разных культур варьирует, к тому же для некоторых культур, таких как малина (*Rubus idaeus* L.), требуется комбинировать криотерапию с термотерапией [51]. Для повышения процента освобожденных от вирусов растений также подходит комбинирование криотерапии и хемотерапии, например, для получения 100 % безвирусного картофеля *Solanum tuberosum* L. [52]. Для получения оздоровленных пробирочных растений цветочных и декоративных культур О.В. Митрофанова сочетала три вида терапии — термотерапию, хемотерапию и культуру апикальных меристем [36].

Несмотря на достаточное количество информации о процессе оздоровления растительного материала, исследователи не пришли к единому мнению о необходимости использования того или иного вида терапии. Общеизвестно только то, что для каждого нового образца необходима отработка всех критериев и параметров оздоровления. Подбор и оптимизация эффективных способов оздоровления растений могут открыть новые перспективы как в вирусологических исследованиях, так и в технологии получения безвирусного посадочного материала. Следует отметить, что для получения безвирусных растений с помощью криотерапии и хемотерапии коллективом лаборатории криосохранения гермоплазмы ИББР достигнуты высокие результаты: картофель (80 %) и яблоня (37,5 %), при этом криотерапия яблони была проведена впервые в мире [19, 52]. Разработанная технология позволяет получать, тестировать и оздоравливать инфицированные *in vitro* растения с минимальными затратами в короткие сроки. Полученные оздоровленные саженцы класса суперэлита, как посадочный материал высокой категории чистоты, послужат для закладки элитных питомников [53, 54].

Учитывая глобальный характер проблемы утраты биоразнообразия, необходимо задействование научных подходов защиты, поддержания и размножения растительного материала. На современном уровне сохранение растений необходимо проводить с учетом применения всех наиболее прогрессивных технологий, в том числе и длительное консервирование генетического материала в криоколлекциях [55–57]. В США криоконсервация является основным способом сохранения генетических ресурсов плодовых, орехоплодных, ягодных культур и винограда с 1987 г. [55, 58]. Национальная система сохранения гермоплазмы растений также создана в большинстве стран Европы, в Китае, Японии, Корее, Перу и во многих других, наряду с обширными полевыми коллекциями имеются так же и криобанки тканей, семян, почек и других органов различных культур, в том числе и яблони [56, 57, 59, 60].

Особенности строения растительных клеток, отличающихся большими размерами, сильной вакуолизацией и, следовательно, большим содержанием воды, вызывают трудности их криоконсервации [49]. Оптимизация методов криосохранения, позволяющих избежать механического повреждения мембран кристаллами льда, вызывающего чрезмерное обезвоживание клеток, позволило разработать несколько эффективных способов криоконсервации растительных тканей. В результате для криоконсервации (криотерапии) яблони используют методы: витрификации, дроплет-витрификации, инкапсуляции-дегидратации, медленного программированного замораживания и др.

Для разработки метода инкапсуляции-дегидратации положила начало технология, используемая для получения искусственных семян. Растительные ткани, как в капсулу, заключают в альгинатный гель, тем самым обезвоживая и подсушивая ткани. Кроме того, внутри клеток предотвращается образование кристаллов льда. После частичного подсушивания (дегидратации) инкапсулированные в альгинат ткани быстро погружают в жидкий азот. Этот метод применим к различным эксплантам: апикальные меристемы, клеточные культуры, соматические зародыши, семена различных видов растений как умеренного климата, так и тропических широт [61, 62].

При проведении метода витрификации растительный материал предварительно обрабатывают высококонцентрированными растворами химических криопротекторов, после чего быстро замораживают [55, 63, 64]. В результате витрификации происходит затвердевание воды в аморфном состоянии, что предотвращает образование внутриклеточных кристаллов льда. Метод применяется для криосо-

хранения апикальных меристем, изолированных клеток и соматических зародышей многих видов растений.

Метод медленного программированного замораживания заключается в обработке меристем химическими криопротекторами так же, как и метод витрификации, особенностью его является охлаждение растительных тканей до определенной температуры в программируемом фризере, например, до -40°C , после чего ткани переносят в жидкий азот (-196°C). При постепенной медленной скорости охлаждения формирование льда начинается во внеклеточном пространстве, благодаря чему предотвращается кристаллизация воды внутри клеток, которые вызывают повреждение мембран и клеточных органелл. Клетки успевают потерять часть воды, компенсируя водный дефицит во внешнем растворе. Для каждого вида растений подбирается оптимальная скорость охлаждения (от 0,1 до $1,0^{\circ}\text{C}/\text{мин}$). Метод программированного замораживания является общепризнанным и наиболее широко распространенным, особенно эффективен для апикальных меристем и почек растений, а также для клеточных культур (суспензии клеток, каллусные ткани) [58].

В лаборатории криосохранения гермоплазмы были проведены эксперименты по криоконсервации методами: витрификации с 0,3М сахарозой, витрификации с 5 % ДМСО, инкапсуляции-дегидратации, медленного программированного замораживания и было выявлено, что для многих культур наиболее эффективным, малозатратным и упрощенным при выполнении является метод витрификации с 0,3М сахарозой, позволяющий получать от 60 до 80 % жизнеспособных апикальных меристем, после размораживания [42]. Этот метод применяется для криосохранения апикальных меристем различных видов растений во многих ведущих мировых лабораториях [55, 58]. Метод основан на предотвращении кристаллизации воды в растительных клетках с помощью обработки высококонцентрированными растворами криопротекторов, которые могут быть токсичными для клеток, поэтому для предотвращения повреждений и гибели клеток длительность обработки должна строго контролироваться для каждого образца [30; 41–43]. Сотрудниками ИББР этот метод оптимизирован для криоконсервации яблони, картофеля, барбариса, малины, груши, жимолости и других культур.

Хранение гермоплазмы растений в жидком азоте в небольших помещениях имеет социальный спрос и экономическую заинтересованность у государства, так как существенно снижает затраты на содержание коллекций в полевых условиях и обеспечивает возможность круглогодичного использования коллекционных образцов в научных исследованиях. Сохранение растительного материала в криобанке обеспечит долгосрочное хранение гермоплазмы экономически ценных образцов для использования в научных и практических целях, будет служить надежным хранилищем в экстремальных ситуациях. Образцы гермоплазмы яблони, сохранённые при сверхнизкой температуре, могут послужить основой для проведения широкого спектра биотехнологических исследований, в том числе и для разработки методологии сохранения генетических ресурсов других культур, особенно редких, исчезающих, эндемичных, реликтовых видов. Созданная криоколлекция может быть вовлечена в селекционный процесс, для закладки элитных питомников, а также для международного обмена генетическими ресурсами [41–43, 55–58, 60].

Производство оздоровленных саженцев влечет развитие местного плодоводства и сельского хозяйства в целом, является решением важных социально-экономических проблем. Учитывая высокое качество саженцев, полученных биотехнологическим путем, повысится урожайность и качество плодовой продукции. Круглогодичное массовое производство саженцев будет способствовать созданию новых рабочих мест на производстве и снизит их себестоимость. Качественная, конкурентно-способная продукция может реализовываться внутри страны и экспортироваться за рубеж, что повысит рейтинг сельского хозяйства Казахстана на мировом рынке.

*Введение растительного материала в культуру *in vitro* и получение асептических растений*

Для успешного проведения всех этапов производства оздоровленных саженцев требуется достаточное количество асептически чистого растительного материала *in vitro*. Поэтому на первом этапе основную роль играют отбор первичного экспланта, технология стерилизации, подбор оптимальных условий культивирования. Для введения в культуру *in vitro* используют: 1) зеленые побеги, отросшие в лабораторных условиях из срезанных в зимний период однолетних одревесневших черенков со спящими почками; 2) в весенне-летний период — зеленые побеги, срезанные с деревьев в полевых условиях; 3) побеги, проросшие из семян дикорастущих яблонь; 4) изолированные из семян зародышевые оси.

В период с января по март с деревьев яблони срезают однолетние побеги длиной 20–30 см, промывают в мыльном растворе и проточной водопроводной воде и стерилизуют в хлорсодержащих отбеливателях, например, в таких как «Белизна» (гипохлорит натрия (5–15 %), щелочные компоненты <5 %, вода) или «Доместос» (< 5 % гипохлорит натрия, анионные ПАВ, неионогенные ПАВ, мыло, отдушка). Обработанные черенки проращивают в воде либо добавляют в воду слабые концентрации макро-, микроэлементов и гормонов. Отросшие зеленые побеги в стерильных условиях ламинарного бокса вновь обрабатывают в хлорсодержащих веществах, в данном случае самым эффективным является 0,1 % раствор сулемы (HgCl_2) [27].

При введении в культуру *in vitro* зеленых побегов, отросших в полевых условиях, используется та же методика, что и для побегов, отросших в лабораторных условиях, только время экспозиции побегов в растворе хлорсодержащих веществ может быть более длительным, так как материал, собранный в полевых условиях, в отличие от побегов, проросших в лабораторных условиях, значительно сильнее поражен бактериальной и грибной инфекцией.

После стерилизации апексы побегов яблони, полученные всеми тремя способами, помещаются на жидкую питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) для микроклонального размножения [29, 65]. Необходимость использования жидкой питательной среды (без добавления агара) связана с тем, что ткани яблони выделяют в питательный раствор фенольные соединения, повторное их поглощение приводит к гибели микрочеренков. Ежедневно побеги яблони переносят на свежую питательную среду для предотвращения некроза. Кроме того, в пробирки с жидкой средой помещают мостики из фильтровальной бумаги для удержания микропобегов на поверхности, чтобы они не утонули. Через 1,5–3 недели жизнеспособные асептические побеги яблони готовы для пересадки в пробирки в твердую питательную среду.

Микроклональное размножение асептического растительного материала

Для полученных пробирочных растений на первом этапе микроклонального размножения требуется проверка инфицированности эксплантов на специализированных питательных средах, так как инфекцию не всегда можно обнаружить визуально, и которая может проявиться при дальнейшем клонировании. В качестве специализированной питательной среды часто используют среду 523, в состав которой входят 10 г/л сахарозы, 8 г/л гидролизата казеина, 4 г/л дрожжевого экстракта, 2 г/л KH_2PO_4 , 0,15 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 г/л желатина, рН 6,9 [66]. Во время пересадки побегов *in vitro* в свежую среду срезают их основания и помещают в чашки Петри со средой 523, культивируют при естественном освещении в течение 1–2 недель. В случае отсутствия микрофлоры в эксплантах среда остается прозрачной, тогда как помутнение среды и рост колоний указывают на инфицированность микропобегов, которые следует сразу же отбраковывать. Дальнейшее микроклональное размножение проводят с проверенными асептическими растениями.

Не исключено повторное инфицирование растений в культуре *in vitro*, или внутренняя бактериальная флора может быть устойчива к стерилизующим компонентам. В таких случаях можно провести хемотерапию с антибиотическими веществами, такими как ампицилин, гентомицин, цефотаксим и др. Однако в культуре тканей поддерживается рост устойчивых к антибиотикам штаммов, что позволяет сохраняться инфекции на низком уровне. К тому же, согласно Thermo Fisher Scientific: «Антибиотики должны использоваться только в качестве крайней меры и только для краткосрочных применений, их необходимо в короткие сроки удалять из культуры тканей» [67]. «Plant Cell Technology» — производитель Plant Preservative Mixture (PPM) — питательной среды, которая предназначена для борьбы с бактериальной и грибной инфекциями сообщает, что PPM имеет широкий спектр действия и ингибирует множество ферментов, поэтому образование по отношению к нему устойчивых штаммов маловероятно [68]. В результате проведенных в лаборатории исследований отмечена эффективность влияния PPM для борьбы с патогенами в культуре *in vitro* для яблони, эксперименты продолжаются.

Диагностика наличия вирусов в растительных тканях

Для проверки на вирусы отбирают растения яблони в полевых условиях и в культуре *in vitro*. Из листьев выделяют тотальные препараты РНК [69]. Качество выделенной РНК определяют разными способами, например, по разделению на электрофореграмме двух рибосомальных РНК (28S и 18S) или с помощью контрольного гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAPDH), или с помощью специфичных праймеров для GAPDH [70].

Подбор специфических праймеров проводят, сравнивая известные нуклеотидные последовательности различных изолятов соответствующих вирусов, идентифицированных в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI), с помощью программы BioEdit [71]. По результатам сравнительного анализа были выявлены наиболее консервативные участки геномов вирусов, к которым применяют дизайн праймеров. Количество РНК измеряют на спектрофотометре.

Обратную транскрипцию и полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводят с реактивами, следуя рекомендациям производителя. Для получения ДНК вирусов используют обратный праймер, который является обратно-комплементарным к нужному участку РНК, для реакции ПЦР используют второй обратный праймер, тем самым увеличивая специфичность к вирусам. Температурный режим амплификатора для реакции ПЦР подбирают эмпирически в соответствии с температурой плавления праймеров. Продукты ПЦР анализируют после электрофореза.

Учеными ИББР на яблоне выявлены 4 вируса ACLSV, ASPV, ASGV и ApMV в различных сочетаниях [16, 19]. Установлено, что клоновые подвои в меньшей степени поражены вирусами (21,1 %), в отличие от сортов. Вероятнее всего, молодые, не подвергнутые прививке, еще не плодоносящие двухлетние растения без внешних повреждений, в отличие от многолетних сортов, не подвергались обрезке и не поражались насекомыми, грибами, нематодами и т.п. Установлено также, что дикорастущие формы вирусами не поражены, возможно, это связано с высоким иммунитетом, устойчивостью к различным заболеваниям дикорастущих плодовых. Только у формы «Ася», привезенной из ГБС, выявлен вирус ACLSV. Скорее всего этот образец в Ботаническом саду был инфицирован контактным способом от других плодовых деревьев.

Криотерапия инфицированных образцов

Криотерапию проводят для инфицированных образцов яблони, для чего можно использовать различные методы криоконсервации. В лаборатории криосохранения гермоплазмы для криотерапии оптимизирован метод витрификации с 0,3 М сахарозой [41], жизнеспособность апикальных меристем после криоконсервации (криотерапии) при использовании этого метода в среднем составляет 68,9 % [40, 41]. Метод проводится в несколько этапов:

1. Закаливание пробирочных растений в лабораторном инкубаторе при переменных в течение суток температурах (8 ч при 22°C, освещенность 10 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ / 16 ч в темноте при -1°C). Для яблони оптимальная длительность закаливания — 3–4 недели.

2. Изолирование апикальных меристем из асептических растений. Апексы изолируют размером 0,8–2,0 мм, состоящие из апикальной меристемы (4–5 слоев клеток) и 2–3 листовых примордиев. Изолирование проводят с использованием бинокулярного микроскопа в стерильных условиях на бумаге, смоченной стерильной дистиллированной водой, для предотвращения пересыхания растительных тканей.

3. Культивирование апикальных меристем на среде с 0,3 М сахарозой. Изолированные апикальные меристемы помещают в стерильные чашки Петри на среду МС с 0,3М сахарозой и культивируют в течение 2 суток также при переменных в течение суток температурах (8 ч при 22°C, освещенность 10 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ / 16 ч в темноте при -1°C).

4. Обработка апикальных меристем криопротектором. Меристемы помещают в криопробирки добавляют в них криопротектор *plant vitrification solution 2* (PVS2) (30 % глицерина, 15 % этиленгликоля, 15 % диметилсульфоксида (ДМСО) в жидкой среде МС с 0,4М сахарозой, pH 5,8, эксперимент проводят при 0 °C температуре, в связи с этим криопробирки помещают в замороженный во льду штатив [41, 58]. Длительность экспозиции в PVS2 – 80 мин.

5. Погружение апикальных меристем в жидкий азот. Криопробирки с опытными меристемами погружают в жидкий азот на 20–60 мин. Оттаивание проводят в водяной бане: 1 мин при 45 °C, затем 1 мин при 25 °C. Контрольные меристемы, которые не погружали в жидкий азот, и опытные после разморозки дважды промывают в среде МС с 1,2 М сахарозой и помещают на питательную среду для регенерации.

Жизнеспособность апикальных меристем после криотерапии оценивают еженедельно в течение 6 недель. Проводят учет выживших меристем (зеленая окраска) и регенерацию новых. Для криотерапии используют 20 апикальных меристем. Опыт выполняют в 3 повторностях (n= 60). Статистическую обработку экспериментальных данных проводят по общепринятым методикам, описанным в пособии Г.Ф. Лакина и в программном пакете SYSTAT [72, 73].

В результате в лаборатории криосохранения гермоплазмы установлено, что 77,8 % образцов яблони сорта «Апорт Александр» после криотерапии освобождается от ACLSV, от ASPV — 44,4 %, от АрMV — 88,9 %. В целом, 33,3 % тестированных образцов этого сорта после криотерапии наличие вирусов не показали [19]. У 66,7 % образцов сорта «Апорт Александр» форма 5 после криотерапии ACLSV не был обнаружен. У сорта «Восход» после криотерапии ACLSV не был идентифицирован, 50 % образцов были оздоровлены от вируса ASPV. Безвирусными у сорта «Синап Алматинский» после криотерапии было 25 % тестированного материала, от вируса ACLSV оздоровилость 75 % растений, а от вируса ASGV — 50 %. У клонового подвоя «Арм 18» форма 1 наличие вируса ACLSV после криотерапии не подтвердилось.

В целом, криотерапия — это эффективный подход для оздоровления растений яблони от вирусов. В среднем 37,5 % тестированного материала безвирусные. Криотерапия не оздоровила только сорт «Ренет Ландсбергский», а у сорта «Апорт кроваво-красный» форма 1 не удалось удалить вирус ACLSV. Эти результаты несколько ниже, чем у картофеля, батата, винограда, но выше чем у малины и хмеля *Humulus lupulus* [43, 45–47, 49]. В статье А. Nukari и других говорится, что не выявлена эффективность метода криотерапии меристемной культуры хмеля для детекции вируса АрMV, когда в экспериментах ученых ИББР 88,9 % побегов сорта «Апорт Александр» после криотерапии были освобождены от вируса АрMV. Возможно, процесс оздоровления зависит от чувствительности растений к вирусам и от самого штамма вируса, так как процент освобождения от вирусов у разных культур варьирует, к тому же для некоторых культур требуется комбинировать криотерапию с термотерапией и хемотерапией [41, 49].

Хемотерапия инфицированных образцов

Хемотерапию проводят для инфицированных вирусами растений яблони *in vitro*, культивируют по пять штук в культуральных сосудах на питательной среде для микроклонального размножения с добавлением противовирусных препаратов. В качестве противовирусного препарата многими исследователями используется рибавирин (1-бета-рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) — синтетический аналог гуанозина, являющийся ингибитором синтеза нуклеиновых кислот вирусов. Этот препарат проявляет свою активность и против РНК- и против ДНК-содержащих вирусов [45, 52, 74–76]. Рибавирин не влияет на синтез РНК в нормально функционирующих клетках растений, поскольку ингибирует селективно только синтез вирусной РНК. Тем не менее на развитие растений он оказывает угнетающее воздействие, которое возрастает с увеличением его концентрации в питательной среде. В изученной литературе авторы предлагают концентрацию рибавирина от 20 до 100 мг/л; чаще всего она составляет 30 мг/л [45, 74]. Наиболее высокая эффективность рибавирина была показана в отношении вирусов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) [52, 75].

Для яблони хемотерапию проводил F. Paprštejn, растения яблони *in vitro* сорта Fragrance культивировали на питательной среде МС с рибавирином в концентрации 20 мг/л и 100 мг по 4 недели для каждого варианта. Выявлено 76 % оздоровления от вирусов ASGV, ACLSV, ASPV [76]. Однако эксперименты, проведенные на единичных сортах или в ограниченном числе, не могут быть достоверными, так как эффективность оздоровления зависит от особенностей генотипов [45, 51, 75–77].

Сотрудниками ИББР также достигнуты положительные результаты по хемотерапии яблони — 100 % оздоровления в культуре *in vitro*, эксперимент проведен для 6 образцов, получен патент на изобретение [78]. В результате всех процедур оздоровления создана безвирусная *in vitro* коллекция, которую в дальнейшем использовали для создания криобанка и получения оздоровленных саженцев. На данный момент безвирусная коллекция апикальных меристем яблони в криобанке насчитывает 74 образца, включающих 54 сорта, 7 клоновых подвоев и 13 дикорастущих форм.

Укоренение в культуре in vitro безвирусных асептических образцов

Следующим этапом в процедуре получения оздоровленных саженцев является ризогенез в культуре *in vitro* — один из наиболее сложных процессов. Основные трудности этого процесса заключаются в том, что без использования фитогормонов группы ауксинов у побегов *in vitro* корни не образуются. В то же время гормоны, в составе питательной среды, могут вызвать, например, разрастание каллуса, что, в свою очередь, нежелательно для микроклонального размножения [79]. Кроме того, процесс ризогенеза зависит от генотипа растения, консистенции питательной среды, на которой идет процесс ризогенеза, ее минерального состава, концентрации в ней углеводов, вида и концентрации

ауксина, соотношения ауксинов с цитокининами, присутствия в питательной среде веществ фенольной природы, длительности субкультивирования, уровня освещенности, температуры и ряда других факторов. Наряду с фитогормонами, существенная роль в процессе ризогенеза принадлежит углеводам и, в частности, сахарозе, например, если сахарозу не добавлять в питательную среду, то даже под воздействием ИМК корни не закладываются. Канадские исследователи С. Chong и Е.-С. Pua показали, что оптимальной концентрацией сахарозы в питательной среде для ризогенеза клонового подвоя яблони Оттава-3 является 30 г/л [80]. Многие авторы, сообщая о положительном влиянии ИМК, ИУК и НУК для получения корней в культуре *in vitro*, рекомендуют 2–4-кратное разбавление основы питательной среды МС [81, 82].

В Лаборатории криосохранения гермоплазмы ИББР тестированы следующие варианты питательных сред для укоренения: 1) ½ МС, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 (вариант 1); 2) ½ МС, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + предварительное выдерживание в растворе с 20 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК)(Sigma-Aldrich) в течение 16 ч (вариант 2); 3) ½ МС, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7, + предварительное выдерживание в растворе с 20 мг/л ИМК в течение 16 ч (вариант 3); 4) ½ МС, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + 0,25 мг/л ИУК (вариант 4); 5) ½ МС, 1,25 г/л джелрайта, 4 г/л агара, рН 5,7 + 0,25 мг/л ИМК (вариант 5) [54]. Установлено, что наиболее оптимальной (упрощенной в приготовлении) является питательная среда (вариант 5), питательные среды: варианты 2–4 также подходят для ризогенеза в качестве альтернативы.

*Перевод оздоровленных образцов яблони в почвенный субстрат,
адаптация полученных саженцев к тепличным условиям*

В производстве саженцев один из самых сложных этапов — это процесс переноса укорененных пробирочных растений из стерильных условий в почвенный субстрат. На адаптацию растений в почвенном субстрате влияют такие физические факторы, как рН, температура, влажность воздуха, освещение и другие, поэтому для каждой культуры оптимизацию приживаемости нужно проводить индивидуально. Обзор литературы выявил, что в качестве компонентов грунта используют различные субстраты: готовые смеси почв, чернозем, торф, перлит, вермикулит, песок, щебенка, опилки и т.п. в различных сочетаниях и пропорциях [18, 36]. В последнее время многие авторы рекомендуют использовать готовую почвенную смесь, в состав которой входят стерильный песок и биогумус, содержащую для жизнедеятельности растения все необходимые элементы. Положительным моментом является и то, что этот субстрат не требует дополнительной обработки, а это экономит время и средства [83].

В процессе адаптации к почвенному субстрату растения испытывают стресс, который проявляется в замедлении роста, потемнении, засыхании и сбрасывании листьев, в результате чего большинство растений часто погибает. При выяснении причин, вызывающих гибель растительного материала при пересадке в почву, выявлено, что у *in vitro* растений, выращенных внутри культуральных сосудов в условиях почти 100-процентной влажности воздуха, широко открыты устьица. В течение первых нескольких суток после пересадки растений происходит потеря большого количества воды в листьях, так как устьица так же остаются открытыми [84]. Кроме того, нарушено поглощение воды и минеральных солей из почвы, так как корни *in vitro* растений практически не имеют корневых волосков. Следовательно, при пересадке в почву низкая поглотительная способность корней и высокая транспирация листьев вызывает гибель растений.

Сотрудниками Лаборатории криосохранения гермоплазмы ИББР разработаны и оптимизированы биотехнологические приёмы переноса, адаптации и выращивания укоренённых регенерантов в почвенном субстрате [54]. В качестве грунта используются: 1) почвенный субстрат «Готовый грунт универсальный», содержащий стерильный песок и биогумус следующего состава: азот (NH_4+NO_3) 20–250; фосфор (P_2O_5) 100–500; калий (K_2O) 100–500; кальций (CaO) 1000–6000; магний (MgO) 500–3000; железо (Fe_2O_3) 50–250 и перлит (мг на 100 г сухого вещества) (вариант 1); 2) смесь стерильного чернозема с перлитом 20:1 (вариант 2); 3) в смесь 1/1 готового почвенного субстрата и стерильного чернозема (вариант 3); 4) смесь чернозема, торфа, перлита в процентном соотношении: 50:40:10 (вариант 4). В результате установлено, что самый высокий процент адаптации — 90 % был выявлен при использовании 4 варианта почвенного субстрата.

Для лучшей приживаемости растительного материала в грунте побеги помещают в полиэтиленовые контейнеры (250 мл) с почвенным субстратом в лунку с влажным стерильным перлитом и накрывают прозрачным пластиковым колпаком или в минипарник (парник, обтянутый полиэтиленом

50x150 см), чтобы остановить испарение влаги. Колпаки и пленку минипарника периодически открывают на 10–15 мин, чтобы проветривание препятствовало образованию плесени и загниванию корней. Первую неделю укорененные регенеранты адаптируют в светокультуральной комнате при $24 \pm 1^\circ\text{C}$, освещенность $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16-часовой фотопериод. Далее саженцы переносят в теплицу, для дальнейшей адаптации при температуре от 15°C до 30°C , влажность 40 % при естественном освещении. Длительность адаптации составляет от 3 до 6 недель, после чего колпаки убирают совсем или контейнер с саженцем переносят из минипарника в теплицу.

После адаптации безвирусных саженцев к тепличным условиям биотехнологическая часть работ заканчивается. Наступает этап переноса и адаптации растительного материала к полевым условиям. Для этого адаптированные тепличные саженцы необходимо передать в крестьянские (фермерские) хозяйства. Клоновые подвои на данном этапе готовы к высадке в открытый грунт, для сортового материала сначала, по необходимости, должна быть проведена окулировка. По прошествии 2–3 лет интенсивный сад начнет плодоношение.

Заключение

Таким образом, в период с 2003 по 2021 гг. в Лаборатории криосохранения гермоплазмы проведены биотехнологические работы, в результате которых отработаны методики введения в культуру *in vitro* микроклонального размножения и криоконсервации различных плодовых, орехоплодных, ягодных, овощных и других культур. В том числе создана асептическая *in vitro* коллекция сортов, клоновых подвоев, дикорастущих форм яблони. Оптимизирован полный цикл получения безвирусных саженцев яблони, от введения в культуру *in vitro* до переноса саженцев в грунт. В дальнейшем, *in vitro* коллекция и полученные оздоровленные саженцы могут быть использованы в научных исследованиях для создания криобанка, а также для получения суперэлитного подвойного и привойного материала, который, в свою очередь, может применяться фермерскими хозяйствами для вовлечения в селекционный процесс по улучшению существующих и созданию новых сортов, а также для международного обмена генетическими ресурсами.

В статье изложена последовательность этапов по производству оздоровленных саженцев яблони. Полученные разработки могут решить проблему насыщенности рынка Республики Казахстан качественным отечественным безвирусным высокоурожайным посадочным материалом яблони. Продвижение реализации на рынке саженцев, полученных биотехнологическим путем, позволит обеспечить население страны экологически чистой отечественной плодовой продукцией с высокими товарными качествами.

Финансирование

Статья является результатом многолетних исследований, проводимых в ИББР при финансовой поддержке Республиканской научно-технической программы (2006–2008 гг.), Программы фундаментальных исследований РК (2003–2008 гг.), Международного научно-технического центра (2002–2008 гг.), Проекта грантового финансирования 0491/ГФЗ (2013–2015 гг.), Проекта гранта коммерциализации 0116–17-ГК (2017–2020 гг.). Проект гранта коммерциализации осуществляется в рамках реализации грантового финансирования коммерциализации РННТД, финансируемого за счет денежных средств ГУ Комитета науки Министерства образования и науки РК.

Список литературы

- 1 Красная книга Казахстана. — Т. 2. Растения. — 2-е изд. перераб. и доп. — Астана: ТОО «Арт Print XXI», 2014. — 452 с.
- 2 Избасаров Д.С. Рекомендации по определению вегетативно размножаемых подвоев яблони и груши (айвы), районированных и перспективных в Казахстане / Д.С. Избасаров, Э.Д. Маденов, К.Г. Карычев, А.И. Янкова, И.П. Савеко, М.В. Уразаева. — Алматы, 2011. — 58 с.
- 3 The Plant List. Version 1.1. (2013). <http://www.theplantlist.org/>
- 4 Сергиевская Е.В. Систематика высших растений. Практический курс / Е.В. Сергиевская. — СПб.: Лань, 2002. — 448 с.
- 5 Velasco R. The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.) / R. Velasco, A. Zharkikh, J. Affourtit, A. Dhingra, A. Cestaro et al. // Nature Genetics. — 2010. — Vol. 42, — N. 10. — P. 833.
- 6 Juniper B.E. The Story of the Apple / B.E. Juniper, D.J. Mabblerley. — Timber Press, 2009. — 240 p.

- 7 Вавилов Н.И. Дикie родичи плодовых деревьев Азиатской части СССР / Н.И. Вавилов // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. — Л., 1931. — Т. 16. — Вып. 3. — С. 120–136.
- 8 Аминов М.Х. Яблоня Сиверса (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) Джунгарского и Заилийского Алатау как исходный материал для селекции: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / М.Х. Аминов. — СПб., 1994. — 21 с.
- 9 Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций (2013). <http://www.fao.org/news/archive/news-by-date/2013/ru/>
- 10 Сальников Е.М. Перспективные сорта яблони для Юга и Юго-Востока Казахстана: пос. для фермеров и садоводов-любителей / Е.М. Сальников. — Алматы, 2010. — 80 с.
- 11 Матушкина О.В. Оптимизация процессов регенерации при размножении клоновых подвоев и сортов яблони и груши *in vitro*: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / О.В. Матушкина. — Мичуринск, 2008. — 23 с.
- 12 Долгих С.Г. Клональное микроразмножение и оздоровление сортов и подвоев яблони / С.Г. Долгих, К.Г. Карычев, Л.В. Остаркова // Научные достижения в биотехнологии, виноградарстве и ягодоводстве. — Алматы: НИЦ «Бастау», 1997. — С. 3–7.
- 13 H. Multiplex RT-PCR Assay for the Detection of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in Infected Korean Apple Cultivars / H. Park, J. Yoon, H. Kim, K. Baek // Plant Pathol. — 2006. — J. 22(2). — P. 168–173.
- 14 R. Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear Plant Cell / R. Tan, L. Wang, N. Hong, G. Wang // Tissue and Organ Culture, 2010. — Vol. 101, — N. 2. — P. 229–235.
- 15 Бриндаров Д.Д. Диагностика вирусных болезней яблони: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Д.Д. Бриндаров. — М., 2005. — 20 с.
- 16 Омашева М.Е. Разработка диагностической тест-системы на основе мультиплекс-ОТ-ПЦР трех вирусов яблони ACLSV, ASGV, ASPV / М.Е. Омашева, З.С. Качиева, Д.А. Копытина, А.М. Касенова, К.П. Аубакирова, Д.А. Ережпепов, Н.Н. Галиакпаров, Н.А. Рябушкина // Поиск. Сер. естеств. и техн. наук. — 2012. — № 2 (1). — С. 27–34.
- 17 Кухарчик Н.В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н.В. Кухарчик. — Минск: Беларус. навука, 2012. — 209 с.
- 18 Сироткин Е.Н. Совершенствование системы производства сертифицированного посадочного материала яблони в условиях ЦЧР: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Е.Н. Сироткин. — Мичуринск, 2008. — 23 с.
- 19 Romadanova N.V. Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.) / N.V. Romadanova, S.A. Mishustina, D.A. Gritsenko, M.Y. Omasheva, N.N. Galiakparov, B.M. Reed, S.V. Kushnarenko // Cryo Letters. — 2016. — Vol. 37 (1). — P. 1–9.
- 20 Дренова Н.В. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан / Н.В. Дренова, М.М. Исин, А.А. Джаймурзина, Г.А. Жармухамедова, А.К. Айткулов // Карантин растений. Наука и практика. — 2013. — № 1. — С. 39–43.
- 21 Избасаров Д.С. Новые сорта плодовых культур — основа повышения конкурентоспособности плодоводства РК / Д.С. Избасаров, Н.Ю. Нургазина и др. // Рекомендации. АО «КазАгроИнновация»; ТОО «Казахский научно-исследовательский институт плодоводства и виноградарства». — Алматы, 2012. — 22 с.
- 22 Kausal N. *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds / N. Kausal, M. Modgil, M. Thakur, D.R. Sharma // Indian J. Exp. Biol. — 2005. — Vol. 43. — P. 561–565.
- 23 Трускинов Э.В. Культура *in vitro* как современный способ воспроизведения, сохранения и интродукции вегетативно размножаемых растений / Э.В. Трускинов // Биолог. разнообразие. Интродукция растений. — СПб., 2007. — С. 85, 86.
- 24 Dobránszki J. Micropropagation of apple — a review / J. Dobránszki, J.A. Teixeira da Silva // Biotechnology Advances. — 2010. — Vol. 28. — I. 4. — P. 462–488.
- 25 Teixeira da Silva J.A. *In vitro* tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications / J.A. Teixeira da Silva, A. Gulyás, K. Magyar-Tábori, M.-R. Wang, Q.-C. Wang, J. Dobránszki // Planta. — 2019. — Vol. 249. — P. 975–1006.
- 26 Reed B.M. Designing a micropropagation system: Workshop presentations from the 1998 sibv congress on *in vitro* biology / B.M. Reed, M.A. Lila, B. McCown, R. Skirvin, R.H. Smith, W.A. Mackay // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant.* — 1999. — Vol. 35 (4). — P. 275–284.
- 27 Ромаданова Н.В. Микроразмножение некоторых сортов яблони: введение в культуру *in vitro* / Н.В. Ромаданова, С.В. Кушнаренко // Поиск. Сер. естеств. и техн. наук. — № 1. — 2006. — С. 54–58.
- 28 Ромаданова Н.В. Введение в культуру *in vitro* и микроразмножение перспективных сортов, клоновых подвоев и дикорастущих форм яблони / Н.В. Ромаданова, С.А. Мишустина, Г.Н. Матакова, И.Р. Рахимбаев, С.В. Кушнаренко // Исследования, результаты. — 2013. — № 3 (059). — С. 142–149.
- 29 Romadanova N.V. *In vitro* collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan / N.V. Romadanova, S.A. Mishustina, G.N. Matakova, S.V. Kushnarenko, I.R. Rakhimbaev, B.M. Reed // Acta Horticulturae. — 2016 — Vol. 1113. — P. 271–277.
- 30 Кушнаренко С.В. Криосохранение апикальных меристем плодовых и ягодных культур: метод. реком. / С.В. Кушнаренко, И.Ю. Ковальчук, Н.В. Ромаданова, Т.Т. Турдиев, Б.М. Рид. — Алматы, 2008. — 58 с.
- 31 Цуркан И.Г. Термическая терапия плодовых, ягодных культур и винограда, пораженных вирусами / И.Г. Цуркан // Вирусные болезни плодовых, ягодных культур и винограда в Молдавии. — 1973. — Вып. 2. — С. 68–124.
- 32 Kegler H. Die Viruses an Gemüsepflanzen, Obstgewachsen und Weinreben in Europe / H. Kegler, H. Kleinhempel, K. Schmelzer, P. Wolf, R. Gippert. — 1977. — Vol. 3 — 389 p.
- 33 Belkegren R.O. Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent A-virus / R.O. Belkegren // Plant Dis. Rep. — 1962. — Vol. 46. — P. 119–121.
- 34 Абраменко Н.М. Получение безвирусной суперэлиты земляники методом культуры верхушечных меристем / Н.М. Абраменко // Вирусные болезни плодово-ягодных культур и винограда в Молдавии. — 1973. — Вып. 2. — С. 26–50.

- 35 Лукичева Л.А. Оздоровление сортов вишни (*Prunus Cerasus* L.) и сливы (*Prunus domestica* L.) от вирусов с использованием биотехнологических приемов / Л.А. Лукичева, О.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко // Тр. Никит. бот. сада. — 2007. — Т. 127. — С. 27–34.
- 36 Митрофанова О.В. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур: сб. науч. тр. ГНБС / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н. Н.Иванова. — 2014. — Т. 138. — С. 5–56.
- 37 Иванова-Ханина Л.В. Оздоровление посадочного материала винограда от вируса мраморности винограда в культуре *in vitro* / Л.В. Иванова-Ханина // Вопросы современной науки и практики. — 2019. — № 1 (71). — С. 23–31.
- 38 Paprstein F. Results of *in vitro* thermotherapy of apple cultivars / F. Paprstein, J. Sedlak, J. Polak, L. Svobodova, M. Hassan, M. Bryxiova // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2008. — Vol. 94. — Iss. 3. — P. 347–352.
- 39 Дорошенко Н.П. Применение антибиотика «Цефотаксим» при клональном микроразмножении винограда / Н.П. Дорошенко // Русский виноград. — 2015. — Т. 1. — С. 62–67.
- 40 Wang Q.C. Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method / Q.C. Wang, J. P.T. Valkonen // Trends in Plant Science. — 2009. — Vol. 14. — № 3. — P. 119–122.
- 41 Kushnarenko S. Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips / S. Kushnarenko, N. Romadanova, B. Reed // Cryo Letters. — 2009. — Vol. 30 (1). — P. 47–54.
- 42 Romadanova N. Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit / N. Romadanova, S. Kushnarenko, L. Karasholakova // In vitro Cellular & Developmental Biology. — 2017. — Vol. 53 (4). — P. 382–393.
- 43 Feng C.H. Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*-grown shoot tips / C.H. Feng, R. Wang, J. Li, B. Wang, Z. Yin, Z. Cui, B.Q. Li, W. Bi, Z. Zhang, M. Li, Q.C. Wang // Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants methods in molecular biology. — 2013. — Vol. 994. — P. 463–482.
- 44 Li B.Q. 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' / B.Q. Li, C.H. Feng, L.Y. Hu, M.R. Wang, Q.C. Wang // An international journal of Annals of Applied Biology. — 2016. — Vol. 168. — Iss. 1. — P. 142–150.
- 45 Wang Q.C. Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of *Potato leafroll virus* (PLRV) and *Potato virus Y* (PVY) / Q.C. Wang, Y. Liu, Y. Xie, M. You // Potato Research. — 2006. — Vol. 49. — P. 119–129.
- 46 Wang Q.C. Elimination of *Grapevine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. / Q.C. Wang, M. Mawassi, P. Li, R. Gafny, I. Sela, E. Tanne // Plant Science. — 2003. — Vol. 165. — P. 321–327.
- 47 Wang Q.C. Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy / Q.C. Wang, J. P.T. Valkonen // Journal of Virological Methods. — 2008. — Vol. 154. — P. 135–145.
- 48 Şekerz M.G. *In vitro* elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy / M.G. Şekerz, V. Süzerer, I.O. Elibuyuk, Y.Ö. Çiftçi // International journal of agriculture & biology. — 2015. — Vol. 17. — Iss. 5. — P. 1066–1070.
- 49 Nukari A. Comparison of virus eradication of *Apple mosaic virus* from hop by encapsulation-dehydration cryotherapy and meristem culture methods / A. Nukari, J. Laamanen, M. Uosukainen, A. Lemmetty // Acta Horticulturae. — 2014. — Vol. 1039. — P. 113–119.
- 50 Wang Q.C. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting material and for cryopreservation of healthy plant genetic resources / Q.C. Wang, P. Bart, F. Engelmann, M. Lambardi, J. P.T. Valkonen // Annals of Applied Biology. — 2009. — Vol. 154. — P. 351–363.
- 51 Wang Q. Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants / Q.C. Wang, W.J. Cuellar, M. Rajamaki, Y. Hirata, J. P.T. Valkonen // Mol. Plant Pathol. — 2008. — Vol. 9. — P. 237–250.
- 52 Kushnarenko S.V. Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro* shoots / S.V. Kushnarenko, N.V. Romadanova, M.M. Aralbayeva, S.Z. Zholamanova, A.M. Alexandrova, O. Karpova // In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant. — 2017. — Vol. 53 (361). — P. 1–8.
- 53 Патент 001528 KZ, A01G 1/06. Способ получения оздоровленных саженцев яблони / Н.В. Ромаданова, С.В. Кушнаренко // Министерство юстиции Республики Казахстан. РГП на праве хоз. вед. «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК. № 1528; заявл.31.07.15/0244.2, опубл. 08.07.16. — Бюлл. № 8.
- 54 Ромаданова Н.В. Производство суперэлитных саженцев сортов и клоновых подвоев яблони / Н.В. Ромаданова, М.М. Нурманов, И.А. Махмутова, С.В. Кушнаренко // Вестн. науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. — 2018. — № 3 (98). — С. 4–13.
- 55 Reed B.M. The basics of *in vitro* storage and cryopreservation / B.M. Reed // National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA, 2002. — P. 34–46.
- 56 Lynch P.T. Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants / P.T. Lynch, E.E. Benson, K. Harding // J. Horticultural Science & Biotechnology. — 2007. — Vol. 82, № 2. — P. 157–160.
- 57 Wu V. Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants / V. Wu, F. Engelmann, Y. Zhao, M. Zhou, S. Chen // Cryo-Letters. — 1999. — Vol. 20. — № 2. — P. 121–130.
- 58 Reed B.M. Plant Cryopreservation. A Practical Guide / B.M. Reed. Springer Science + Business Media, 2008. — 513 p.
- 59 Popov A.S. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences / A.S. Popov, E.V. Popova, T.V. Nikishina, O.N. Vysotskaya // International Journal of Refrigeration. — 2006. — Vol. 29, Iss. 3. — P. 403–410.
- 60 Kim H.H. Cryobanking of Korean Allium Germplasm Collections: Results from a 10 Year Experience / H.H. Kim, E. Popova, D.J. Shin, J.Y. Yi, C.H. Kim, J.S. Lee, M.K. Yoon, F. Engelmann // Cryo Letters. — 2012. — Vol. 33, № 1. — P. 45–57.

- 61 Dereuddre J. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen / J. Dereuddre, C. Scottez, Y. Arnaud, M. Duron // C.R. Acad. Sci. — 1990. — Vol. 3, № 10. — P. 317–323.
- 62 Plessis P. Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions / P. Plessis, C. Leddet, A. Collas, J. Dereuddre // Cryo-Letters. — 1993. — Vol. 14. — P. 309–320.
- 63 Sakai A. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress / A. Sakai, W. Larcher. — Berlin etc.: Springer-Verlag, 1987. — P. 321.
- 64 Niino T. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of mulberry by vitrification / T. Niino, A. Sakai, S. Enomoto, J. Magosi, S. Kato // Cryo-Letters. — 1992. — Vol. 13. — P. 303–312.
- 65 Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. — 1962. — Vol. 15. — P. 473–479.
- 66 Viss P. R. A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture / P.R. Viss, E.M. Brooks, J.A. Driver // *In Vitro* Cell. Dev. Biol. — 1991. — Vol. 27. — 42 p.
- 67 ThermoFisher Scientific. — [ЭП] <https://www.thermofisher.com/kz/en/home.html>
- 68 Plant Cell Technology. — [ЭП] <https://www.plantcelltechnology.com/our-story/>
- 69 Helliot B. Immunogold silver staining associated with epi-fluorescence for cucumber mosaic virus localisation on semi-thin sections of banana tissues / B. Helliot, B. Panis, J.P. Busogoro, S. Sobry, Y. Poumay, M. Raes, R. Swennen, P. Lepoivre // European Journal of Histochemistry. — 2007. — Vol. 51. — P. 153–158.
- 70 Походенко П.А. Эффективность серологических, молекулярных и индикаторных методов диагностики вирусов косточковых культур: автореф. ... канд. с.-х. наук / П.А. Походенко. — М., 2009. — 22 с.
- 71 Bio Edit is a biological sequence alignment editor [ЭП] <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/BioEdit.html>
- 72 Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пос. для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
- 73 1 3 SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
- 74 Danci O. Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication / O. Danci, L. Erdei, L. Vidacs, M. Danci, A. Baci, I. David, F. Berbentea // J. Horticulture, Forestry and Biotechnology. — 2009. — Vol. 13. — P. 421–425.
- 75 Faccioli G. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy / G. Faccioli, G. Loebenstein, P.H. Berger, A.A. Brunt, R.H. Lawson // In: Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes. — The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001. — P. 65–390.
- 76 Paprštejn F. Results of *in vitro* chemotherapy of apple cv. Fragrance — Short communication / F. Paprštejn, J. Sedlák, L. Svobodová, J. Polák, S. Gadiou // Hort. Sci. (Prague). — 2013. — Vol. 40, № 4. — P. 186–190.
- 77 Ухатова Ю.В. Совершенствование методов криоконсервации и оздоровления от вирусных болезней образцов вегетативно размножаемых культур: автореф. ... дис. канд. биол. наук / Ю.В. Ухатова. — СПб., 2017. — 22 с.
- 78 Патент № 34902. Способ получения оздоровленных от вирусов саженцев яблони хемотерапией / Н.В. Ромаданова, М.М. Нурманов, С.В. Кушнаренко // Министерство юстиции Республики Казахстан. РГП на праве хоз. вед. «Институт биологии и биотехнологии растений» КН МОН РК. — № 34902; заявл.31.01.2020/0056.1., опубл. 26.02.21.
- 79 Кривокопа Л.И. Применение биостимуляторов для укоренения и роста древесных растений / Л.И. Кривокопа, Н.М. Бакташева // Биологическое разнообразие. Интродукция растений. — СПб., 2007. — С. 586–589.
- 80 Chong C. Carbon nutrition of Ottawa-3 apple rootstock during stages of *in vitro* propagation / C. Chong, E. -C. Pua // J. Hortic. Science. — 1985. — Vol. 60, № 3. — P. 285–290.
- 81 Fira A. *In vitro* rooting and *ex-vitro* acclimation in apple (*Malus domestica*) / A. Fira // Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med. — 2010. — Vol. 67, № 1. — P. 480.
- 82 Sharma M. Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol / M. Sharma, M. Modgil, D.R. Sharma // Indian. J. Exp. Biol. — 2000. — Vol. 38. — P. 1236–1240.
- 83 Жумабеков Е.Ж. Ускоренное выращивание сеянцев хвойных пород и оценка их адаптивных свойств в условиях закрытого грунта / Е.Ж. Жумабеков, А.А. Бегимбетов, Э. Шаденова, Д. Ларионова // Биотехнология в мире животных и растений: материалы Междунар. науч.-практ. конф. — Бишкек, 2005. — С. 278–285.
- 84 Клейн Р.М. Адаптация древесных растений *in vitro* в открытом грунте / Р.М. Клейн, Д.Т. Клейн // Методы исследования растений. — М., 1974. — С. 47–52.

Н.В. Ромаданова, С.В. Кушнаренко

Вируссыз алма көшеттерін алудың биотехнологиясы

Шолу мақалада биотехнологиялық әдістерді қолдана отырып, сау алма көшеттерін өндіру бойынша жұмыстардың кезекті кезеңдері анық көрсетілген. Криоконсервацияның (криотерапия), хемотерапия, вирустарды анықтаудың барлық кезеңдеріне арналған қоректік орталардың құрамы, *in vitro* культурасына енгізу әдістері, микрокларалды көбейту, *in vitro* жағдайында тамырландыру және өсімдік материалын топырақ субстратына бейімдеу ұсынылған. Нәтижесінде биотехнологиялық әдістерді қолдана отырып, вируссыз *in vitro* *Malus domestica* Borkh. мен *M. sieversii* Ledeb. M. Roem., коллекциясы құрылып (+ 23–25°C) және (+ 4 °C) температурада сақталынады. Ежелгі және тауарлық бағалы сорттардың, клонды телітушінің апикальды меристемаларын, сондай-ақ жабайы алма формаларын -196 °C сұйық азоттағы криоконсервациялау осы бағалы өсімдік материалын ұзақ уақыт

сактауға мүмкіндік бере отырып және қажет болған жағдайда құрылған криоколлекцияны селекция процесінде пайдалануға болады. Агроөнеркәсіптік кешен субъектілері вируссыз теліту және алма сорттарын суперэлиталық кластағы отырғызу материалымен қолдана алады, бұл жалпы жергілікті питомниктің дамуына үлес қосады.

Кілт сөздер: *Malus*, *in vitro* коллекциясы, крио және хемотерапия, криобанк, суперэлиталық көшеттер.

N.V. Romadanova, S.V. Kushnarenko

Biotechnology for obtaining virus-free apple planting stocks

The review describes the successive stages of work on the production of virus-free apple planting stocks using biotechnology methods. Compositions of nutrient media, duration and temperature regime of plant material treatment, and other details for all stages of cryopreservation (cryotherapy), chemotherapy, detection of viruses are presented, methods of *in vitro* initiation, micropropagation, *in vitro* rooting and adaptation of plant material to the soil substrate are discussed. Virus-free collection of *Malus domestica* Borkh. and *M. sieversii* Ledeb. M. Roem. is preserved by *in vitro* culture and cold storage (+4 °C). Cryopreservation of shoot tips of apple historic cultivars and wild forms in liquid nitrogen at -196° will preserve this valuable material for a long time and, if necessary, can be used in breeding. Virus-free apple rootstocks and cultivars will be available to provide planting material of a super-elite class for local nurseries and in general will promote the development of the domestic nursery.

Keywords: *Malus*, *in vitro* collection, cryo- and chemotherapy, cryobank, super-elite planting stocks.

References

- 1 Krasnaia kniga Kazakhstana. Rasteniia [The Red book of Kazakhstan. Plants] (2014). Vol. 2. Astana: LTD «Art Print XXI» [in Russian].
- 2 Izbasarov, D.S., Madenov, E.D., Karychev, K.G., Yankova, A.I., Saveko, I.P. & Urazaeva, M.V. (2011). *Rekomendatsii po opredeleniiu vegetativno-razmnozhaemykh podvoev yabloni i grushi (aivy) raionirovannykh i perspektivnykh v Kazakhstane* [Recommendations for the determination of vegetatively propagated apple and pear (quince) stocks zoned and promising in Kazakhstan]. Almaty [in Russian].
- 3 The Plant List. Version 1.1. (2013). *theplantlist.org*. Retrieved from <http://www.theplantlist.org/>
- 4 Sergievskaja, E.V. (2002). *Sistematika vysshikh rastenii: Prakticheskii kurs* [Systematics of Higher Plants: A Practical Course]. Vol. 2. Saint Petersburg: Lan [in Russian].
- 5 Velasco, R., Zharkikh, A., & Affourtit, J. et. al. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh). *Nature Genetics*, 42, 10; 833.
- 6 Juniper, B. E. & Mabberley, D. J. (2009). *The Story of the Apple*. Timber Press, 240.
- 7 Vavilov, N.I. (1931). Dikie rodichi plodovykh derevev Aziatskoi chasti SSSR [Wild relatives of fruit trees in the Asian part of the USSR]. *Trudy po prikladnoi botanike, genetike i seleksii — Works on applied botany, genetics and selection*, 16, 3 [in Russian].
- 8 Aminov, M.Kh. (1994). Yablonia Siversa (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) Dzhungarskogo i Zailiiskogo Alatau kak iskhodnyi material dlia seleksii [*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.) of the Dzungar and Zaili Alatau as a source material for breeding]. *Thesis PhD*. Saint Petersburg [in Russian].
- 9 Prodovolstvennaia i selskokhoziaistvennaia organizatsiia obiedinennykh natsii [Food and Agriculture Organization of the United Nations] (2013). *fao.org*. Retrieved from <http://www.fao.org/news/archive/news-by-date/2013/ru/> [in Russian].
- 10 Salnikov, E.M. (2010). *Perspektivnye sorta yabloni dlia Iuga i Iugo-Vostoka Kazakhstana* [Promising apple varieties for the South and South-East of Kazakhstan]. Almaty [in Russian].
- 11 Matushkina, O.V. (2008). Optimizatsiia protsessov regeneratsii pri razmnozhenii klonovykh podvoev i sortov yabloni i grushi *in vitro* 2008. [Optimization processes of regeneration during the propagation of clonal rootstocks and varieties of apple and pear in vitro]. *Thesis PhD*. Michurinsk [in Russian].
- 12 Dolgikh, S.G., Karychev, K.G. & Ostarkova, L.V. (1997). Klonalnoe mikrorazmnozhenie i ozdorovlenie sortov i podvoev yabloni [Micropropagation and recovery of apple varieties and rootstocks]. *Nauchnye dostizheniia v biotekhnologii, vinogradarstve i yagodovodstve — Scientific achievements in biotechnology, viticulture and berry growing*. Almaty: Scientific Research Center «Bastau», 3–7 [in Russian].
- 13 Park, H., Yoon, J., Kim, H. & Baek, K. (2006). Multiplex RT-PCR Assay for the Detection of Apple stem grooving virus and Apple chlorotic leaf spot virus in Infected Korean Apple Cultivars. *Plant Pathol.*, 22, 2, 168–173.
- 14 Tan, R., Wang, L., Hong, N. & Wang, G. (2010). Enhanced efficiency of virus eradication following thermotherapy of shoot-tip cultures of pear Plant Cell. *Tissue and Organ Culture*, 101, 2, 229–235.
- 15 Brindarov, D. D. (2005). Diagnostika virusnykh boleznei yabloni [Diagnostics of apple viral diseases]. *Thesis PhD*. Moscow [in Russian].
- 16 Omasheva, M.E., Kachieva, Z.S., Kopytina, D.A., Kasenova, A.M., Aubakirova, K.P., Erezhepov, D.A., et al. (2012). Razrabotka diagnosticheskoi test-sistemy na osnove multipleks OT-PTsR trekh virusov yabloni ACLSV, ASGV, ASPV [Develop-

ment of a diagnostic test system based on multiplex RT-PCR of three apple viruses ACLSV, ASGV, ASPV]. *Poisk. Seriya estestvennykh i tekhnicheskikh nauk — Find, series natural and technical science*, 2 (1); 27–34 [in Russian].

17 Kukharchik, N.V. (2012). *Virusnye i fitoplazmennye bolezni plodovykh i yagodnykh kultur v Belarusi [Viral and phytoplasmic diseases of fruit and berry crops in Belarus]*. Minsk: Belaruskaiia navuka [in Russian].

18 Sirotkin, E.N. (2008). Sovershenstvovanie sistemy proizvodstva sertifikirovannogo posadochnogo materiala yabloni v usloviakh TsChR [Improvement of the production system of certified apple planting material in the conditions of the Central Black Earth Region]. *Thesis PhD*. Michurinsk [in Russian].

19 Romadanova, N.V., Mishustina, S.A., Gritsenko, D.A., Omasheva, M.Y., Galiakparov, N.N., Reed, B.M. & Kushnarenko, S.V. (2016). Cryotherapy as a method for reducing the virus infection of apples (*Malus* sp.). *Cryo Letters*, 37, 1; 1–9.

20 Drenova, N.V., Isin, M.M., Dzhamurzina, A.A., Zharmukhamedova, G.A. & Aitkulov, A. K. (2013). Bakterialnyi ozhog plodovykh kultur v Respublike Kazakhstan [Bacterial burn of fruit crops in the Republic of Kazakhstan]. *Plant Quarantine. Karantin rastenii. Nauka i praktika — Plant quarantine. Science and practice*, 1; 39–43 [in Russian].

21 Izbasarov, D.S., Nurtazina, N.Yu. & et al. (2012). Novye sorta plodovykh kultur — osnova povysheniia konkurentosposobnosti plodovodstva RK [New varieties of fruit crops — the basis for increasing the competitiveness of fruit growing in the Republic of Kazakhstan]. *Rekomendatsii. AO «KazAgroInnovatsiia»; TOO «Kazakhskii nauchno-issledovatel'skii institut plodovodstva i vinogradarstva»*. Almaty [in Russian].

22 Kausal, N., Modgil, M., Thakur, M. & Sharma, D.R. (2005). In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. *Indian J. Exp. Biol.*, 43, 561–565.

23 Truskinov, E.V. (2007). Kultura *in vitro* kak sovremennyi sposob vosproizvedeniia, sokhraneniia i introduksii vegetativno razmnozhaemykh rastenii [In vitro culture as a modern way of propagation, preservation and introduction of vegetatively propagated plants]. *Biologicheskoe raznoobrazie. Introduksiia rastenii — Biological Diversity. Plant Introduction*. Saint Petersburg [in Russian].

24 Dobránszki, J. & Teixeira da Silva, J.A. (2010). *Micropropagation of apple — a review*. *Biotechnology Advances*, 28, 4, 462–488.

25 Teixeira da Silva, J.A., Gulyás, A., Magyar-Tábori, K., Wang, M. -R., Wang, Q-C. & Dobránszki, J. (2019). In vitro tissue culture of apple and other *Malus* species: recent advances and applications. *Planta*, 249, 975–1006.

26 Reed, B.M., Lila, M.A. McCown, B., Skirvin, R., Smith, R.H. & Mackay, W.A. (1999). Designing a micropropagation system: Workshop presentations from the 1998 sibv congress on in vitro biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology — Plant*, 35, 4, 275–284.

27 Romadanova, N.V. & Kushnarenko, S.V. (2006). Mikroklonalnoe razmnozhenie nekotorykh sortov yabloni: vvedenie v kulturu *in vitro* [Micropropagation of some apple varieties: *in vitro* culture introduction]. *Poisk. Seriya estestvennykh i tekhnicheskikh nauk — Find. Seried natural and technical science*, 1; 54–58 [in Russian].

28 Romadanova, N.V., Mishustina, S.A., Matakova, G.N., Rakhimbaev, I.R. & Kushnarenko, S.V. (2013). Vvedenie v kulturu *in vitro* i mikroklonalnoe razmnozhenie perspektivnykh sortov, klonovykh podvoev i dikorastushchikh form yabloni [In vitro introduction and micropropagation of promising varieties, clonal rootstocks and wild apple forms]. *Issledovaniia, rezultaty — Find, results*, 3 (059); 142–149 [in Russian].

29 Romadanova, N.V., Mishustina, S.A., Matakova, G.N., Kuhsnarenko, S.V., Rakhimbaev, I.R. & Reed, B.M. (2016). In vitro collection of *Malus* shoot cultures for cryogenic bank development in Kazakhstan. *Acta Horticulturae*, 1113, 271–277.

30 Kushnarenko, S.V., Kovalchuk, I.Yu., Romadanova, N.V., Turdiev, T.T., Rid, B.M. & Rakhimbaev, I.R. (2008). *Kriosokhraneniie apikalnykh meristem plodovykh i yagodnykh kultur [Cryopreservation of fruit and berry shoot tips]*. Almaty [in Russian].

31 Tsurkan, I.G. (1973). Termicheskaia terapiia plodovykh, yagodnykh kultur i vinograda, porazhennykh virusami [Thermal therapy of fruit, berry crops and grapes affected by viruses]. *Virusnye bolezni plodovykh, yagodnykh kultur i vinograda v Moldavii — Viral diseases of fruit and berry crops and grapes in Moldova*, 2; 68–124 [in Russian].

32 Kegler, H., Kleinhempel, H., Schmelzer, K., Wolf, P. & Gippert, R. (1977). Die Viruses an Gemüsepflanzen, Obstgewachsen und Weinreben in Europe. *Pflanzliche Virology*, 3, 389.

33 Belkegren, R.O. (1962). Culture of apical meristems of *Fragaria vesca* strawberry plants as a method of excluding latent A-virus. *Plant Dis. Rep.*, 46, 119–121.

34 Abramenko, N.M. (1973). Poluchenie bezvirusnoi superelity zemlianiiki metodom kultury verkhushchinykh meristem [Obtaining a virus-free superelite strawberry by the method of shoot tips culture]. *Virusnye bolezni plodovo-yagodnykh kultur i vinograda v Moldavii — Viral diseases of fruit and berry crops and grapes in Moldova*, 2; 26–50 [in Russian].

35 Lukicheva, L.A., Mitrofanova, O.V. & Lesnikova-Sedoshenko, N.P. (2007). Ozdorovlenie sortov vishni (*Prunus Serasus* L.) i slivy (*Prunus Domestica* L.) ot virusov s ispolzovaniem biotekhnologicheskikh priemov [Improvement of cherry (*Prunus Cerasus* L.) and plum (*Prunus Domestica* L.) varieties from viruses using biotechnological methods]. *Trudy Nikitskogo botanicheskogo sada — Works of the Nikitkii Botanical Garden*, 127; 27–34 [in Russian].

36 Mitrofanova, O.V., Mitrofanova, I.V., Lesnikova-Sedoshenko, N.P. & Ivanova, N.N. (2014). Primeneniie biotekhnologicheskikh metodov v ozdorovlenii rastenii i razmnozhenii bezvirusnogo posadochnogo materiala perspektivnykh tsvetochno-dekorativnykh kultur [Application of biotechnological methods for plantshealth and virus-free planting material production promising flower and decorative crops]. *Sbornik nauchnykh trudov GNBS — Book of articles of Main Nikitskii Botanical Garden*, 138; 5–56 [in Russian].

37 Ivanova-Khanina, L.V. (2019). Ozdorovlenie posadochnogo materiala vinograda ot virusa mramornosti vinograda v kulture *in vitro* [Improvement of grape planting material from the *in vitro* grape marbling virus]. *Voprosy sovremennoi nauki i praktiki — Questions of modern Science and Practice*, 1 (71); 23–31 [in Russian].

38 Paprstein, F., Sedlak, J., Polak, J., Svobodova, L., Hassan, M. & Bryxiova, M. (2008). Results of in vitro thermotherapy of apple cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 3, 347–352.

39 Doroshenko, N.P. (2015). Primeneniie antibiotika Tsefotaksim pri klonalnom mikrorazmnozhenii vinograda [The use of the antibiotic cefotaxime in micropropagation of grapes]. *Russkii vinograd — Russian Grape*, 1; 62–67 [in Russian].

- 40 Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2009). Cryotherapy of the shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends in Plant Science*, 14, 3, 119–122.
- 41 Kushnarenko, S., Romadanova, N. & Reed, B. (2009). Cold acclimation improves regrowth of cryopreserved apple shoot tips. *Cryo Letters*, 30, 1, 47–54.
- 42 Romadanova, N., Kushnarenko, S., & Karasholakova, L. (2017). Development of a common PVS2 vitrification method for cryopreservation of several fruit. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 53, 4, 382–393.
- 43 Feng, C.H., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., et al. (2013). Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of in vitro-grown shoot tips. *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants methods in molecular biology*, 994, 463–482.
- 44 Li, B.Q., Feng, C.H., Hu, L.Y., Wang, M.R. & Wang, Q.C. (2016). 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'. *An international journal of Annals of Applied Biology*, 168, 1, 142–150.
- 45 Wang, Q.C., Liu, Y., Xie, Y. & You, M. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of Potato leafroll virus (PLRV) and Potato virus Y (PVY). *Potato Research*, 49, 119–129.
- 46 Wang, Q.C., Mawassi, M., Li, P., Gafny, R., Sela, I. & Tanne, E. (2003). Elimination of Grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, 165, 321–327.
- 47 Wang, Q.C. & Valkonen, J.P.T. (2008). Elimination of two viruses which interact synergistically from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy. *Journal of Virological Methods*, 154, 135–145.
- 48 Şekerz, M.G., Süzerer, V., Elibuyuk, I.O. & Çiftçi, Y.Ö. (2015). In vitro elimination of PPV from infected apricot shoot tips via chemotherapy and cryotherapy. *International journal of agriculture & biology*, 17, 5, 1066–1070.
- 49 Nukari, A., Laamanen, J., Uosukainen, M. & Lemmetty, A. (2014). Comparison of viruse eradication of Apple mosaic virus from hop by encapsulation-dehydration cryotherapy and meristem culture methods. *Acta Horticulturae*, 1039, 113–119.
- 50 Wang, Q.C., Bart, P., Engelmann, F., Lambardi, M. & Valkonen, J.P.T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting material and for cryopreservation of healthy plant genetic resources. *Annals of Applied Biology*, 154, 351–363.
- 51 Wang, Q., Cuellar, W.J., Rajamaki, M., Hirata, Y. & Valkonen, J.P.T. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips to efficient production of virus-free plants. *Mol. Plant Pathol*, 9, 237–250.
- 52 Kushnarenko, S.V., Romadanova, N.V., Aralbayeva, M.M., Zholamanova, S.Z., Alexandrova, A.M. & Karpova, O. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro shoots. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 53, 361, 1–8.
- 53 Romadanova, N.V. & Kushnarenko, S.V. (2016). Patent 001528 KZ, A01G 1/06. Sposob polucheniia ozdorovlennykh sazhentsev yabloni [Method of obtaining healthy apple planting stocks]. Ministerstvo uistitsii Respubliki Kazakhstan. RGP «Institut biologii i biotekhnologii rastenii» KN MON RK. № 1528; zaiavl.31.07.15/0244.2, opubl. 08.07.16. Builleten № 8 [in Russian].
- 54 Romadanova, N.V., Nurmanov, M.M., Makhmutova, I.A. & Kushnarenko, S.V. (2018). Proizvodstvo super-elitnykh sazhentsev sortov i klonovykh podvoev yabloni [Production of super-elite planting stocks of apple varieties and clonal rootstocks]. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S.Seifullina — Bulletin of Science of S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University*, 3 (98); 4–13 [in Russian].
- 55 Reed, B. M. (2002). The basics of in vitro storage and cryopreservation. National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, O.R. USA, 34–46.
- 56 Lynch, P.T., Benson, E.E. & Harding, K. (2007). Climate change: the role of ex situ and cryo-conservation in the future security of economically important, vegetatively propagated plants. *J. Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 2, 157–160.
- 57 Wu, V., Engelmann, F., Zhao, Y., Zhou, M. & Chen, S. (1999). Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning of donor plants. *Cryo-Letters*, 20, 2, 121–130.
- 58 Reed B.M. (2008). *Plant Cryopreservation. A Practical Guide*. Springer Science + Business Media, LLC, 513.
- 59 Popov, A.S., Popova, E.V., Nikishina, T.V. & Vysotskaya, O.N. (2006). Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences. *International Journal of Refrigeration*, 29, 3, 403–410.
- 60 Kim, H.H., Popova, E., Shin, D.J., Yi, J.Y., Kim, C.H., Lee, J.S., Yoon, M.K. & Engelmann, F. (2012). Cryobanking of Korean Allium Germplasm Collections: Results from a 10 Year Experience. *CryoLetters*, 33, 1, 45–57.
- 61 Dereuddre, J., Scottez, C., Arnaud, Y. & Duron, M. (1990). Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) in vitro plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen. *C.R. Acad. Sci.*, 3, 10, 317–323.
- 62 Plessis, P., Leddet, C., Collas, A. & Dereuddre, J. (1993). Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions. *Cryo-Letters*, 14, 309–320.
- 63 Sakai, A. & Larcher, W. (1987). *Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress*. Berlin etc.: Springer-Verlag, 321.
- 64 Niino, T., Sakai, A., Enomoto, S., Magosi, J. & Kato, S. (1992). Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of mulberry by vitrification. *Cryo-Letters*, 13, 303–312.
- 65 Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 15, 473–479.
- 66 Viss, P.R., Brooks, E.M. & Driver, J.A. (1991). A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27, 42.
- 67 Thermo Fisher Scientific. *thermofisher.com*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/kz/en/home.html/>
- 68 Plant Cell Technology. *plantcelltechnology.com*. Retrieved from <https://www.plantcelltechnology.com/our-story/>

- 69 Helliot, B., Panis, B., Busogoro, J.P., Sobry, S., Poumay, Y., Raes, M., Swennen, R. & Lepoivre, P. (2007). *European Journal of Histochemistry*, 51, 153–158.
- 70 Pokhodenko, P.A. (2009). Effektivnost serologicheskikh, molekuliarnykh i indikatornykh metodov diagnostiki virusov kostochkovykh kultur [The effectiveness of serological, molecular and indicator methods for the diagnosis of viruses in stone fruit crop]. *Thesis PhD*. Moscow [in Russian].
- 71 BioEdit is a biological sequence alignment editor. *chemistry.umeche*. Retrieved from <http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/BioEdit.html>
- 72 Lakin, G.F. (1990). *Biometriia [Biometrics]*. Moscow: Vysshaya shkola [in Russian].
- 73 SYSTAT (2007) SYSTAT 12.0, SYSTAT Software, Inc, San Jose, CA, pp. Statistics software.
- 74 Danci, O., Erdei, L., Vidacs, L., Danci, M., Baci, A., David, I. & Berbentea, F. (2009). Influence of ribavirin on potato plants regeneration and virus eradication. *J. of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 13, 421–425.
- 75 Faccioli, G., Loebenstein, G., Berger, P.H., Brunt, A.A. & Lawson, R.H. eds. (2001). Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures, thermotherapy and chemotherapy. In: *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed Potatoes*. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- 76 Paprštejn, F., Sedlák, J., Svobodová, L., Polák, J. & Gadiou, S. (2013). Results of in vitro chemotherapy of apple cv. *Frangance* — *Short communication*. *Hort. Sci. (Prague)*, 40, 4, 186–190.
- 77 Ukhatova, Yu.V. (2017). Sovershenstvovanie metodov kriokonservatsii i ozdorovleniia ot virusnykh boleznei obratstv vegetativno-razmnozhaemykh kultur [Improvement of cryopreservation methods and eradication from viral diseases of vegetatively propagated crops]. *Thesis PhD in Biology*. Saint Petersburg [in Russian].
- 78 Romadanova, N.V., Nurmanov, M.M. & Kushnarenko, S.V. (2021). Patent № 34902. Sposob polucheniia ozdorovlennykh ot virusov sazhentsev yabloni khemoterapii [Method for obtaining apple planting stocks revitalized from viruses by chemotherapy]. Ministerstvo yustitsii Respubliki Kazakhstan. RGP ved. «Institut biologii i biotekhnologii rastenii» KN MON RK — N 34902; zaiavl.31.01.2020/0056.1., opubl. 26.02.21 [in Russian].
- 79 Krivokora, L.I. & Baktasheva, N.M. (2007). Primenenie biostimulatorov dlia ukoreneniia i rosta drevesnykh rastenii [Application of biostimulants for rooting and growth of woody plants]. *Biologicheskoe raznoobrazie. Introduktsiia rastenii — Biological Diversity. Plant Introduction*, 586–589 [in Russian].
- 80 Chong, C. & Pua, E.-C. (1985). Carbon nutrition of Ottawa-3 apple rootstock during stages of in vitro propagation. *J. Hortic. Science*, 60, 3, 285–290.
- 81 Fira, A., Clapa, D. & Plopa, C. (2010). In vitro rooting and ex-vitro acclimation in apple (*Malus domestica*). *Cluj Napoca: Bul. Univ. Agr. Sci. and Vet. Med*, 67, 1, 480.
- 82 Sharma, M., Modgil, M. & Sharma, D.R. (2000). Successful propagation in vitro of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. *Indian. J. Exp. Biol*, 38, 1236–1240.
- 83 Zhumabekov, E.Zh., Begimbetov, A.A., Shadenova, E., & Larionova, D. (2005). Uskorennoe vyrashchivanie seiantsv khvoinykh porod i otsenka ikh adaptivnykh svoistv v usloviakh zakrytogo grunta [Accelerated cultivation of coniferous seedlings and assessment of their adaptive properties in greenhouses]. *Biotehnologiya v mire zhivotnykh i rastenii: materialy Mezhdunarodnoi naucho prakticheskoi konferentsii — Biotechnology in world animals and plants: materials of sci-pract. conf.* (p. 278–285). Bishkek [in Russian].
- 84 Klein, R.M. & Klein, D.T. (1974). *Adaptatsiia drevesnykh rastenii in vitro v otkrytom grunte. Metody issledovaniia rastenii [Adaptation of woody in vitro plants in the open field. Methods of plant study]*. Moscow [in Russian].