

ОЗДОРОВЛЕНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ВИНОГРАДА ОТ ВИРУСА МРАМОРНОСТИ ВИНОГРАДА В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

Л. В. Иванова-Ханина

ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
им. В. И. Вернадского», г. Симферополь, Крым, Россия

Рецензент д-р биол. наук, доцент Н. А. Егорова

Ключевые слова: виноград; вирус мраморности винограда; культура апикальных меристем; культура *in vitro*; термотерапия *in vitro*.

Аннотация: С помощью иммуноферментного анализа (ИФА) выявлено содержание в образцах вируса мраморности винограда. Для оздоровления растительного материала от вирусов методом культуры апикальных меристем использовали апикальные меристемы почек глазка размером 0,2 – 0,3, 0,5 – 0,7 и 0,8 – 1,0 мм. Для термотерапии *in vitro* использовали микропобеги винограда размером 12 – 15 мм, полученные методом культуры апикальных меристем. Термотерапию осуществляли при температуре 38 ± 1 °С в течение 18 – 20 суток, с увеличением длительности обработки жизнеспособность существенно снижалась.

В результате повторного ИФА установлено, что культура апикальных меристем размером 0,2 – 0,3 и 0,5 – 0,7 мм позволила существенно снизить концентрацию вируса в тканях – показатель экстинкции составил 0,002 – 0,004 опт. ед. при значении положительного контроля 0,187 – 0,223. Сочетание метода культуры апикальных меристем с термотерапией *in vitro* в течение 18 – 20 дней не дало существенного эффекта.

Введение

Поражение растений инфекционными болезнями различной этиологии (грибной, микоплазменной, вирусной, бактериальной) является одной из основных причин снижения урожайности виноградников. Потери уро-

Иванова-Ханина Лидия Владимировна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры фитобиологии, Академия биоресурсов и природопользования (структурное подразделение), e-mail: lidaivanova-khanina@gambler.ru, ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», п. Аграрное, г. Симферополь, Республика Крым, Россия.

жая винограда вследствие поражения насаждений болезнями варьируют в пределах 30 – 80 % [1 – 3]. Особое место занимают вирусные и вирусоподобные заболевания, которые наиболее широко распространены в зоне привитой культуры. Распространяются вирусные болезни различными путями: почвенными нематодами, тлями, цикадами и т. д. Вредоносность вирусных заболеваний заключается в снижении массы прироста, количества и качества урожая, уровня приживаемости растений, а также ухудшении других агробиологических показателей [4 – 6]. Кроме того, вирусные болезни являются хроническими и системными, то есть растения болеют до конца жизненного цикла и поражаются все органы растения [6, 7].

Флоэмоограниченный, механически непереносимый изометрический вирус мраморности винограда – Grapevine fleck virus (**GFkV**) – имеет размер 28 – 30 нм. Распространен во всех виноградарских районах и входит в четверку наиболее распространенных вирусов в ряде стран [4, 7 – 9]. При этом переносчик вируса либо отсутствует, либо не установлен. Заболевание протекает латентно, симптомы вируса мраморности проявляются только на привое Рупестрис дю Ло, в виде просветления жилок третьего и четвертого порядков и прилегающих к ним тканей [10]. В случае сильного проявления симптомов происходит угнетение растения-индикатора, на листьях верхнего яруса сильнее проявляются симптомы хлороза, наблюдается значительное пасынкообразование [10, 11]. Болезнь отрицательно влияет на развитие корней подвоя, а также на его способность к прививке.

Вследствие латентного характера болезни санитарная селекция и агробиологический контроль не могут выбраковывать инфицированные данным вирусом растения. Агротехнологические и химические меры борьбы не способны обеспечить эффективную систему защитных мероприятий, а средств, позволяющих излечить больные вирусами растения, в настоящее время не существует. Пораженные растения используются для размножения, вследствие чего инфекция распространяется на значительных площадях [7]. Альтернативой является использование для оздоровления метода культуры апикальных меристем растений. На сегодняшний день это одно из наиболее перспективных направлений в борьбе с системными и хроническими заболеваниями винограда [1, 12]. Оздоровление от вирусов особенно актуально для многолетних культур, в которых концентрация вирусов с каждым годом увеличивается. Ценность оздоровленного материала обусловлена тем, что во время его репродукции синтез вирусного белка в растениях осуществляется медленно, в результате замедляется накопление вирусной инфекции [6].

Цель работы – определить эффективность метода культуры апикальных меристем, а также сочетание его с термотерапией для получения оздоровленного посадочного материала.

Материал и методы

Материалом для исследования служили растения винограда *Vitis vinifera* L. сорта Каберне Совиньон, произрастающие в коллекционных насаждениях Академии биоресурсов и природопользования ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского», расположенных в Предгорной зоне Крыма.

Тестирование исходных растений и растений после терапии на наличие GFkV проводили с использованием метода иммуноферментного анализа прямым (DAS) и непрямым (DASI) сендвич-методом (ELISA) [13, 14]. Для диагностики использовали наборы фирмы «Агритест» (Италия). Образцы ткани (соскобы кортикального слоя донорных растений, растения-регенеранты) растирали в экстракционном буфере из расчета 1 : 15 (масса / объем). Все реагенты и образцы наносили на микроплату по 150 мкл в двухкратной повторности. После каждого этапа микроплату промывали промывочным буфером. Учет результатов проводили с помощью анализатора иммуноферментных реакций «Униплан», определяя оптическую плотность при длине волны 405 нм.

Учет результатов проводили после инкубации с раствором субстрата в течение 30 минут при комнатной температуре. Для каждого образца наличие или отсутствие вируса определяли путем сравнения оптической плотности тестируемого образца со значением оптической плотности негативного контроля. Варианты, имеющие значение оптической плотности выше значения негативного контроля, считали инфицированными.

Для получения оздоровленного посадочного материала использовали метод культуры апикальных меристем и сочетание его с методом термотерапии. В работе применялись общепринятые биотехнологические методики [15, 16], в качестве эксплантов использовали апикальные меристемы размером 0,2 – 0,3, 0,5 – 0,7 и 0,8 – 1,0 мм, которые выделяли из зимующих почек винограда. Поверхностную стерилизацию проводили последовательной обработкой фрагментов зеленых побегов 70%-м этанолом в течение 35 с и 50%-м раствором препарата «Брадофен» (Benzoxonium chloride, Венгрия) в течение 12 мин с последующей трехкратной промывкой в стерильной воде. Культивирование меристем осуществляли на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением бензиламинопурина (БАП) в концентрации 1,0 мг/л и гибберелловой кислоты (ГК₃) – 0,5 мг/л. Экспланты культивировали при температуре 24 – 26°C, относительной влажности воздуха 60 – 70 %, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2 – 3 клк.

Для термотерапии отбирали микропобеги, полученные после регенерации и переносили их на питательную среду с пониженным содержанием БАП (0,1 мг/л) и повышенным – ГК₃ (1,0 мг/л). Для адаптации растений к повышенной температуре растения в пробирках помещали в термокамеру с температурным режимом 26 ± 1 °C и постепенно, в течение 7 суток повышали температуру до 38 ± 1 °C. В период адаптации к термотерапии и на этапе собственно термотерапии соблюдали 16-часовой фотопериод.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовали пакет прикладных программ Excel 7.0 для Windows 97. В таблицах представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Результаты и обсуждение

Основными элементами системы освобождения растений от вирусов и получения высококачественного оздоровленного посадочного материала являются 4 блока-метода, составляющие единый биотехнологический процесс:

- 1) тестирование исходных растений на наличие вирусной инфекции;
- 2) терапия больных растений;
- 3) культивирование растительных тканей и регенерация растений;
- 4) ретестирование растений-регенерантов на наличие вирусов [5].

Выделенные исходные растения винограда были подвергнуты лабораторному анализу для выявления наиболее вредоносных вирусов: скручивания листьев 1-го и 3-го серотипов (**GLRaV1**, **GLRaV3**), короткокузлия винограда (**GFLV**) и **GFkV**. Показатель экстинкции растительных экстрактов с сыворотками, специфичными к **GFLV**, **GLRaV1**, **GLRaV3** находился на уровне отрицательного контроля ($E_{405} = 0,003 - 0,033$ опт. ед.). В то же время, полученные в результате проведенного ИФА данные показали, что исследуемые образцы содержат антигены **GFkV**. Показатель экстинкции растительных экстрактов с сыворотками, специфичными к **GFkV**, близок к положительному контролю ($E_{405} = 0,250 \pm 0,012$ опт. ед.).

Визуально выявить поражение растений **GFkV** практически невозможно ни на подвойных, ни на привойных сортах, поскольку симптомы заболевания отсутствуют на всех европейских сортах и на большинстве американских сортов и гибридов. Таким образом, единственным способом выявления скрытого поражения растений **GFkV** является лабораторный анализ.

Для оздоровления растительного материала от вирусов использовали метод культуры апикальных меристем размером 0,2 – 1,0 мм и сочетание его с термотерапией *in vitro*. При использовании метода культуры апикальных меристем анализировали интенсивность регенерационных процессов апикальных меристем глазка винограда размером 0,2 – 0,3 мм с одним-двумя листовыми примордиями, 0,5 – 0,7 мм с двумя-тремя парами примордиальных листочков и 0,8 – 1,0 мм – с одним-двумя кроющими листочками. Более успешно этап введения в культуру *in vitro* осуществлен для эксплантов большего размера по сравнению с меристематическими верхушками (табл. 1).

Анализ полученных данных позволяет проследить тенденцию к увеличению частоты регенерации эксплантов с увеличением их размера. Использование апикальных меристем размером 0,8 – 1,0 мм было более

Таблица 1

**Развитие эксплантов винограда сорта Каберне Совиньон
в условиях *in vitro* в зависимости от размера меристем
(60 суток культивирования)**

Размер экспланта, мм	Биометрические показатели		
	Частота регенерации, %	Высота основного побега, мм	Число побегов, шт.
0,2 – 0,3	37,0 ± 2,7	4,08 ± 0,22	1,35 ± 0,11
0,5 – 0,7	42,5 ± 5,0	5,11 ± 0,14	1,33 ± 0,14
0,8 – 1,0	47,5 ± 2,5	5,63 ± 0,23	1,27 ± 0,08

эффективным, чем при использовании апикальных меристем 0,2 – 0,3 мм, уровень регенерации эксплантов составил $47,5 \pm 2,5$. Следует отметить, что высота побегов при использовании эксплантов размером 0,5 – 1,0 мм была существенно выше, чем при использовании меристем меньшего размера. В то же время не выявлено существенных различий между вариантами использования эксплантов размерами 0,5 – 0,7 и 0,8 – 1,0 мм.

В период культивирования апикальных меристем происходило формирование дополнительных побегов, которое отмечалось во всех вариантах эксперимента и незначительно варьировало в зависимости от размера экспланта от $1,27 \pm 0,08$ до $1,35 \pm 0,11$ шт.

Таким образом, наиболее целесообразным является культивирование апикальных меристем размером 0,5 – 0,7 мм, при котором высота формирующегося побега выше ($5,11 \pm 0,14$ мм), чем при использовании эксплантов меньшего размера ($4,08 \pm 0,22$ мм), а вероятность проникновения вируса ниже, чем при использовании эксплантов большего размера.

Для термотерапии *in vitro* использовали микропобеги винограда размером 12 – 15 мм, полученные методом культуры апикальных меристем. При анализе количества жизнеспособных микропобегов винограда в период воздействия повышенными температурами отмечено, что в течение 18 суток термотерапии сохранялась 100 % жизнеспособность побегов, после чего наблюдалось постепенное снижение этого показателя. Так, на 22 – 24 день термообработки количество жизнеспособных побегов составляло 78 – 75 % от общего числа побегов, на 30-й день – 55 %, а дальнейшее воздействие повышенными температурами снижало количество жизнеспособных побегов до 30 – 25 % (рис. 1).

Таким образом, для микропобегов сорта Каберне Совиньон оптимальной экспозицией термотерапии *in vitro* является 18 – 20 дней, в течение которых сохраняется значительное количество визуально жизнеспособных побегов (86 – 100 %).

Следует отметить, что в течение первых 16 суток культивирования у микропобегов отмечено формирование в среднем 1,5 – 2,1 узлов, но в дальнейшем интенсивность роста побегов снижалась. Отмечено, что

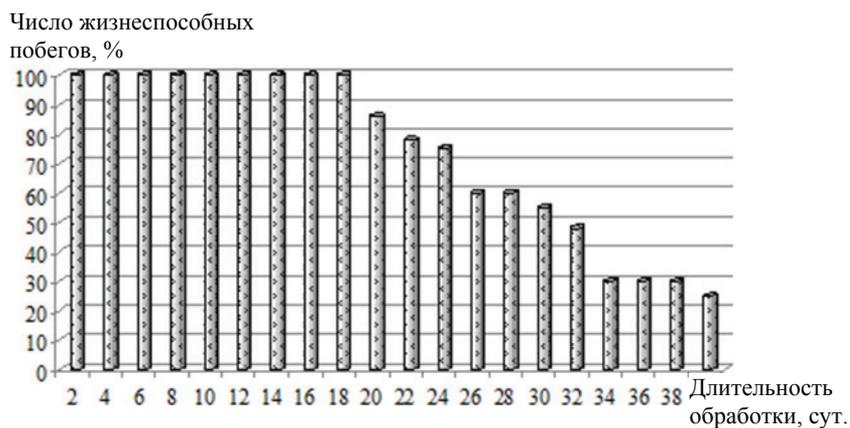


Рис. 1. Число жизнеспособных микропобегов сорта Каберне Совиньон в зависимости от длительности термотерапии *in vitro*

за период термотерапии междоузлия побегов были короче, чем в вариантах без термообработки. Такое явление, очевидно, связано с угнетающим действием стрессового фактора на растения, препятствующее росту клеток растяжением и снижающее интенсивность интеркалярного роста.

Сразу после снятия температурного стресса у растений, подвергнутых термотерапии, отделяли и культивировали верхушки побегов высотой 3 – 4 мм и микрочеренки побега с одной пазушной почкой.

Приживаемость оказалась высокой в обоих вариантах и составила 98 – 100 %. Интенсивность роста побегов также существенно не отличалась при культивировании верхушек побегов и микрочеренков, но уступала интенсивности роста микропобегов, не подвергавшихся термотерапии. За 30 суток культивирования растения, подвергнутые термообработке, достигали высоты 10 – 12 мм, тогда как в контроле этот показатель составлял 18 – 22 мм. Очевидно, в этом сказалось последствие температурного стресса.

Детекцию антигенов GFkV у растений после оздоровления проводили также методом ИФА. В результате установлено, что культура апикальных меристем размером 0,2 – 0,3 и 0,5 – 0,7 мм позволила существенно снизить концентрацию вируса в тканях – показатель экстинкции составил 0,002 – 0,004 опт. ед. Сочетание метода культуры апикальных меристем с термотерапией в течение 18 – 20 дней не дало существенного эффекта, поскольку показатель экстинкции практически не изменился (табл. 2).

Таким образом, использование метода культуры апикальных меристем было эффективным для оздоровления растений винограда сорта Каберне Совиньон от вируса мраморности винограда.

Таблица 2

Результаты тестирования после применения методов оздоровления винограда сорта Каберне Совиньон

Варианты	Показатель экстинкции, опт. ед.
Контроль:	
отрицательный	0,000 – 0,001
положительный	0,187 – 0,223
Донорные растения	0,250 ± 0,012
Растения после терапии:	
1) методом культуры апикальных меристем, мм:	
0,2 – 0,3	0,002 ± 0,0000
0,5 – 0,7	0,004 ± 0,0001
0,8 – 1,0	0,018 ± 0,0004
2) сочетанием метода культуры апикальных меристем и термотерапии <i>in vitro</i> :	
верхушки оздоровленных побегов	0,003 ± 0,0001
узлы оздоровленных побегов	0,003 ± 0,0002

Выводы

1. Выявлено поражение вирусом мраморности винограда коллекционных насаждений сорта Каберне Совиньон в Предгорной зоне Крыма. Показатель экстинкции растительных экстрактов с сыворотками, специфичными к GFkV составил $0,250 \pm 0,012$ опт. ед.

2. Установлена высокая эффективность метода культуры апикальных меристем для оздоровления винограда сорта Каберне Совиньон от вируса мраморности винограда. Показатель экстинкции при культивировании апикальных меристем размером 0,2 – 0,3 мм и 0,5 – 0,7 мм составил 0,003 – 0,004 опт. ед.

3. Установлено, что количество жизнеспособных микропобегов сорта Каберне Совиньон при термотерапии *in vitro* ($38 \pm 1^\circ\text{C}$) сохраняется на уровне 100 % в течение 18 – 20 дней.

Список литературы

1. Дорошенко, Н. П. Метод апикальных меристем в борьбе против вирусной инфекции винограда / Н. П. Дорошенко // Виноград и вино России. – 1999. – № 2. – С. 6 – 9.

2. Дорошенко, Н. П. Особенности клонального микроразмножения винограда / Н. П. Дорошенко. – Новочеркасск : Изд-во ФГБНУ «Всерос. науч.-исследоват. ин-т виноградарства и виноделия им. Я. И. Потапенко», 2014. – 204 с.

3. Введение новых сортов винограда в культуру *in vitro* [Электронный ресурс] / Л. Л. Бунцевич [и др.] // Политематический сетевой электрон. науч. журн. КубГАУ. – 2016. – № 123 (09). – С. 339 – 346. – Режим доступа : <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/23.pdf> (дата обращения: 31.01.2019)

4. Мулюкина, Н. А. Вирусные болезни и бактериальный рак винограда / Н. А. Мулюкина – Одесса : ННЦ «ИВиВ им. В. Е. Таирова», 2005. – 148 с.

5. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / О. В. Митрофанова [и др.]. – Ялта : Крымпресс, 2000. – 45 с.

6. Аникина, И. Н. Фитовирусология : учебное пособие / И. Н. Аникина, Д. Д. Сейтжанова. – Павлодар : Кереку, 2015. – 104 с.

7. Тулаева, М. И. Перспективы развития производства сертифицированного посадочного материала винограда в Украине / М. И. Тулаева, Н. А. Мулюкина // Виноградарство и виноделие XXI столетия : материалы междунар. симпозиума, 2005 г. – Одесса : Optimum, 2005. – С. 50 – 55.

8. Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of Grapevine Fleck Virus / S. Sabanadzovic [et. al.] // Journal of General Virology. – 2001. – Vol. 82, No. 8. – P. 2009 – 2015.

9. Shi, B. J. Nucleotide Sequence Variation in a Small Region of the Grapevine Fleck Virus Replicase Provides Evidence for two Sequence Variants of the Virus / B. J. Shi, N. Habili, R. H. Symons // Annals of Applied Biology. – 2003. – Vol. 142. – P. 349 – 355.

10. Вірусні та бактеріальні хвороби винограду / Б. Н. Мілкус [и др.]. – Одеса : Одеса, 2012. – 157 с.

11. Віруси та вірусні хвороби винограду (*Vitis* sp.) / І. Д. Жунько [и др.]. – Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 3. – С. 6 – 20.

12. Вирусные и вирусоподобные болезни плодовых культур и оздоровление растений способом клонального микроразмножения *in vitro* / Л. Л. Бунцевич [и др.] // Проблемы интенсивного садоводства. – Краснодар, 2010. – С. 191 – 193.

13. Гнutowa, P. B. Иммунологические исследования в фитовирусологии / P. B. Гнutowa ; ред. Н. С. Дяченко. – М. : Наука, 1985. – 183 с.
14. Clark, M. F. Enzyme Immunosorbent Assay in Plant Virology / M. F. Clark, M. Bar-Joseph // *Methods in Virology*. – 1984. – No. 7. – P. 51 – 85.
15. Бутенко, P. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / P. Г. Бутенко – М. : Наука, 1964. – 272 с.
16. Kartha, K. K. Meristem Culture / K. K. Kartha ; ed. by O. L. Gamborg, L. R. Wette // *Plant Tissue Culture Methods*. – Saskatoon : N.R.C. Canada, 1975. – P. 39 – 43.

References

1. Doroshenko N.P. [The method of apical meristems in the fight against viral infection of grapes], *Vinograd i vino Rossii* [Grapes and wine of Russia], 1999, no. 2, pp. 6-9. (In Russ.)
2. Doroshenko N.P. *Osobennosti klonal'nogo mikrorazmnozheniya vinograda* [Peculiarities of clonal micropropagation of grapes], Novocherkassk: Izdatel'stvo FGBNU “Vserossiyskiy nauchno-issledovatel'skiy institut vinogradarstva i vinodeliya im. Ya. I. Potapenko”, 2014, 204 p. (In Russ.)
3. <http://ej.kubagro.ru/2016/09/pdf/23.pdf> (accessed 31 January 2019)
4. Mulyukina N.A. *Virusnyye bolezni i bakterial'nyy rak vinograda* [Virus diseases and bacterial cancer of grapes], Odessa: NNTS “IViV im. V. Ye. Tairova”, 2005, 148 p. (In Russ.)
5. Mitrofanova O.V., Slavgorodskaya-Kurpiyeva L.Ye., Mitrofanova I.V., Lukicheva L.A. *Diagnostika virusnykh bolezney i biotekhnologicheskoye priyemye polucheniya bezvirusnogo posadochnogo materiala kostochkovykh plodovykh kul'tur* [Diagnosis of viral diseases and biotechnological techniques for obtaining a virus-free planting material of stone fruit crops], Yalta: Krympress, 2000, 45 p. (In Russ.)
6. Anikina I.N., Seytzhanova D.D. *Fitovirusologiya: uchebnoye posobiye* [Phytovirology: study guide], Pavlodar: Kereku, 2015, 104 p. (In Russ.)
7. Tulayeva M.I., Mulyukina N.A. *Vinogradarstvo i vinodeliye XXI stoletiya: materialy mezhdunarodnogo simpoziuma* [Vineyard and winemaking of the XXI century: materials of the international symposium], Odessa: Optimum, 2005, pp. 50-55. (In Russ.)
8. Sabanadzovic S., Ghanem-Sabanadzovic N.A., Saldarelli P., Martelli G.P. Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of Grapevine Fleck Virus, *Journal of General Virology*, 2001, vol. 82, no. 8, pp. 2009-2015.
9. Shi B.J., Habili N., Symons R.H. Nucleotide Sequence Variation in a Small Region of the Grapevine Fleck Virus Replicase Provides Evidence for two Sequence Variants of the Virus, *Annals of Applied Biology*, 2003, vol. 142, pp. 349-355.
10. Milkus B.N., Limans'ka N.V., Zhun'ko I.D., Konup L.A., Ageeva O.V. *Virusni ta bakterial'ni khvoroby vynohradu* [Viral and bacterial diseases of grapes], Odessa: Odessa, 2012, 157 p. (In Ukr.)
11. Zhun'ko I.D., Limans'ka N.V., Milkus B.N., Ivanytsya V.O. [Viruses and viral diseases of grapes (*Vitis* sp.)], *Mikrobiolohiya i biotekhnolohiya* [Microbiology and biotechnology], 2015, no. 3, pp. 6-20. (In Ukr.)
12. Buntsevich L.L., Zakharova M.V., Kostyuk M.A., Danilyuk Yu.P., Zakharchenko R.S. *Problemy intensivnogo sadovodstva* [Problems of intensive gardening], Krasnodar, 2010, pp. 191-193. (In Russ.)
13. Gnutova R.V., Dyachenko N.S. [Ed.] *Immunologicheskoye issledovaniya v fitovirusologii* [Immunological studies in phytovirology], Moscow: Nauka, 1985, 183 p. (In Russ.)

14. Clark M.F., Bar-Joseph M. Enzyme Immunosorbent Assay in Plant Virology, *Methods in Virology*, 1984, no. 7, pp. 51-85.
15. Butenko R.G. *Kul'tura izolirovannykh tkaney i fiziologiya morfogeneza rasteniy* [Culture of isolated tissues and physiology of plants morphogen], Moscow: Nauka, 1964, 272 p. (In Russ.)
16. Kartha K.K., Gamborg O.L., Wette L.R. [Eds.] *Plant Tissue Culture Methods*, Saskatoon: N.R.C. Canada, 1975, pp. 39-43.
-

Improving the Planting Material of Grapes from the Calico Virus of Grapes *in vitro*

L. V. Ivanova-Khanina

V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Crimea, Russia

Keywords: grapes; grapes calico virus; apical meristem culture; *in vitro* culture; *in vitro* thermotherapy.

Abstract: With the help of enzyme immunoassay, the content of grape calico virus in the virus samples was detected. For the recovery of plant material from viruses using the culture of apical meristem, apical meristem buds of ocelli sized 0.2-0.3, 0.5-0.7 and 0.8-1.0 mm were used. For *in vitro* thermotherapy, micro-shoots of grapes, 12 to 15 mm in size, obtained by culture of apical meristems, were used. Thermotherapy was carried out at a temperature of 38 ± 1 °C for 18-20 days, with an increase in the duration of treatment, the viability decreased significantly.

As a result of the repeated enzyme immunoassay, it was established that the culture of apical meristem of 0.2-0.3 and 0.5-0.7 mm in size allowed to significantly reduce the virus concentration in tissues - the extinction index was 0.002-0.004 opt. units with a positive control value of 0.187-0.223. The combination of the apical meristem culture method with *in vitro* thermotherapy for 18-20 days did not produce a significant effect.

© Л. В. Иванова-Ханина, 2019