

ОЗДОРОВЛЕНИЕ МАЛИНЫ ОТ ВИРУСА КУСТИСТОЙ КАРЛИКОВОСТИ (RBDV) МЕТОДОМ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

О.Ю. АНТОНОВА, кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник

С.Е. ДУНАЕВА, кандидат биологических наук, стар-
ший научный сотрудник

Ю.В. УХАТОВА, младший научный сотрудник

Н.Ю. КАМЫЛИНА, младший научный сотрудник

Н.А. ДОЛГАНОВА, научный сотрудник

О.В. ЛИСИЦЫНА, лаборант-исследователь

Т.А. ГАВРИЛЕНКО, доктор биологических наук, зав.
отделом

Федеральный исследовательский центр Всерос-
сийский институт генетических ресурсов растений
имени Н.И. Вавилова, ул. Большая Морская, 42-44,
Санкт-Петербург, 190000, Россия

E-mail: olgaant326@mail.ru

Резюме. Изучено влияние различных методов терапии на эффективность оздоровления от вируса кустистой карликовости малины (RBDV) в культуре *in vitro*. Растения 41 селекционного сорта малины из коллекции ВИР (каждый сорт был представлен полевым растением и его *in vitro* аналогом) протестированы на присутствие RBDV методом ИФА. В полевой коллекции RBDV выявлен у 17 сортов (41,5%), у 8 из них вирусом были поражены также *in vitro* клоны. Для оздоровления отобраны микрорастения 7 сортов: Dogmanred, Ottawa, Бальзам, Высокая, Новокитаевская, Самарская Плотная, Спутница. Терапию проводили в четырех вариантах: химиотерапия на среде с рибавирином (30 мг/л) или РНКазой (0,01%) и комплексная терапия, совмещающая химиотерапию теми же реагентами с обработкой повышенной температурой (35°C). Для всех сортов отмечено угнетение роста и развития растений на средах с рибавирином, по сравнению со средами с РНКазой. Повышенная температура также приводила к угнетению растений и снижению их жизнеспособности. Сочетание термотерапии с обработкой рибавирином вызывало гибель почти половины микрорастений. Наиболее термостойкими оказались сорта Dogmanred, Новокитаевская и Самарская Плотная. Выжившие клоны (от 2 до 22 для каждого сорта, всего 49) повторно протестировали методом ИФА. Практически все свободные от RBDV растения были получены посредством комплексной терапии. При этом использование рибавирина давало лучшие результаты, по сравнению с РНКазой (соответственно 60 и 25% оздоровленных клонов). Химиотерапия без термообработки оказалась недостаточно эффективна, этим методом удалось оздоровить только 1 растение на среде с РНКазой.

Ключевые слова: RBDV, малина, термотерапия, химиотерапия

Для цитирования: Оздоровление малины от вируса кустистой карликовости (RBDV) методом комплексной терапии в культуре *in vitro* / О.Ю. Антонова, С.Е. Дунаева, Ю.В. Ухатова, Н.Ю. Камылина, Н.А. Долганова, О.В. Лисицына, Т.А. Гавриленко // Достижения науки и техники АПК. 2015. Т. 29. №7. С. 61-64.

Вирус кустистой карликовости малины – *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) – наиболее распространенный патоген дикорастущих и культурных растений рода *Rubus* [1]. Поражение RBDV приводит к существенному снижению продуктивности и качества урожая малины и ежевики [2]. Вирус широко распространен в Северной и Южной Америке [3, 4], Азии [5, 6], Европе [7-12], Российской Федерации и сопредельных странах [13-16].

В природных условиях RBDV передается от зараженных растений через зараженные клоны и семена, а также с пыльцой, что способствует его быстрому

распространению и делает вирус трудно контролируемым [17]. Для профилактики RBDV рекомендуют использовать высоко устойчивые сорта или высаживать оздоровленные безвирусные растения.

Согласно литературным данным, эффективность оздоровления инфицированных RBDV растений зависит от способа терапии. По сведениям Wang et al. [18] и Wang and Valkonen [19], элиминация этого вируса с использованием только одного метода культуры меристем фактически невозможна, поскольку он способен проникать в меристематические ткани растений. Известно [14] о низкой эффективности оздоровления сортов малины в вариантах с применением химиотерапии *in vitro* с использованием различных препаратов (рибавирин, азацитидин, дицианамид). Для единичных сортов малины есть сведения об эффективной элиминации RBDV под воздействием химиотерапии с применением салициловой кислоты [20]. Перспективный метод оздоровления растений малины от RBDV – магнитотерапия [20, 21].

RBDV относится к термолабильным вирусам, поэтому можно ожидать, что эффективным для оздоровления зараженных растений малины окажется использование методов термотерапии. Однако в литературе имеется противоречивая информация по этому вопросу. Так, по данным Упадышева [20], суховоздушная термотерапия (38°C в течение 30-65 сут.) в сочетании с *in vitro* культурой апексов размером 0,3-1 мм обеспечивает высокий выход оздоровленных растений (от 60 до 100%). Напротив, Wang et al. [18] не выявили ни одного оздоровленного от RBDV растения при действии различных вариантов термотерапии (38°/26°C – 16/8 ч фотопериод в течение 3-5 недель) в сочетании с *in vitro* культурой апексов размером 0,2 мм. Эти же авторы отмечают существенное снижение жизнеспособности микрорастений при действии повышенной температуры. Результаты экспериментов Wang et al. [18, 22] свидетельствуют об эффективности использования для оздоровления малины от RBDV криотерапии в сочетании с термотерапией.

Необходимо отметить, что подавляющее число исследований по оздоровлению малины от RBDV выполнено на единичных сортах. Между тем, согласно литературным данным, успех антивирусной терапии зависит от особенностей взаимодействия конкретных генотипов растений и вирусов [18].

Цель нашего исследования – изучение влияния различных методов антивирусной терапии на жизнеспособность сортов малины и эффективность их оздоровления от вируса кустистой карликовости (RBDV) в культуре *in vitro*.

Условия, материалы и методы. В качестве материала для исследований использовали селекционные сорта малины – образцы из полевой коллекции ВИР (Павловская опытная станция) и *in vitro* коллекции ВИР. Растения из *in vitro* коллекции культивировали на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с половинным составом макроэлементов и утроенным количеством хелата железа [23, 24].

Детекцию RBDV проводили методом ИФА с использованием набора реактивов фирмы Agdia, включавшего позитивный и негативный контроли. Для тестирования брали листья полевых и *in vitro* растений; в последнем случае использовали нижние листья развитых микрорастений после 2-3 месяцев культивирования. Растительный материал растирали в жидком азоте до состояния мелкого порошка, добавляли лизирующий буфер и далее следовали протоколу, рекомендованному фирмой-изготовителем [25]. По результатам ИФА отбирали зараженное RBDV пробирочные растения, каждое из которых маркировали и размножали черенкованием (на среде МС ранее указанного состава с добавлением 0,1 мг/л ИМК и 0,1 мг/л гиббереллина) для постановки опытов по оздоровлению.

Оздоровление проводили методами химиотерапии и комплексной терапии (совместное действие термо- и химиотерапии) в четырех вариантах (А-Д) опытов. Химиотерапию осуществляли на питательных средах с добавлением рибавирина (Sigma, #R9644-50) в концентрации 30 мг/л (вариант А) или РНКазы (Диа-М, #SRib.0001) в концентрации 0,01% (вариант В); растворы противовирусных реагентов стерилизовали фильтрованием (фильтры Millex-GV, диаметр пор 0,22 мкм). В опытах по химиотерапии верхние

части побегов *in vitro*-растений длиной одно-два междоузлия без листьев помещали на питательную среду с противовирусными агентами и выдерживали в течение 4 недель на светоустановке при температуре 24-26°/18-20°С, фотопериод – 16/8 ч. У подросших микрорастений повторно отсекали верхние части побегов, переносили их на свежую среду того же состава, и процедуру химиотерапии повторяли. Всего проводили три цикла обработки материала химическими препаратами. В вариантах комплексной терапии микрорастения, культивируемые на питательных средах с рибавирином или РНКазой, в течение 4 недель инкубировали при постоянной повышенной температуре 35°С (соответственно варианты С или D) в камере Barnsted (фотопериод – 16/8 ч). Затем верхние части побегов длиной 1-2 междоузлия переносили на свежую питательную среду того же состава и повторяли термообработку. На третьем этапе растения инкубировали на средах с противовирусными препаратами на светоустановке при 24-26°/18-20°С. Всего при комплексной терапии было проведено два цикла термообработки и три цикла обработки химическими препаратами.

Прошедшие оздоровление микрорастения помещали на питательную среду без противовирусных реагентов и через 2-3 мес. анализировали на присутствие RBDV методом ИФА.

Таблица 1. Результаты тестирования методом ИФА сортов малины из полевой и *in vitro* коллекций ВИР на присутствие RBDV

Сорт	№ образца	Наличие RBDV по результатам ИФА	
		в <i>in vitro</i> -растениях	в растениях полевой коллекции
Cornuells Victoria	8247	–	–
Dormanred	41956	+	+
Fallgold	39382	–	+
Festival	29868	–	+
Malling jewel	21387	–	–
Ottawa	1203	+	+
Phoenix	25944	–	–
Veten	21455	–	–
Бабье Лето	35923	–	–
Бальзам	35477	+	+
Барнаульская	31185	+	+
Беглянка	40719	–	–
Блестящая	40484	–	–
Брянская	35922	–	–
Вера	35928	–	+
Высокая	25941	+	+
Грушовка Ленинградская	15224	–	–
Желтоплодная	40736	–	–
Зоренька Алтай	13922А	–	–
Иллюзия	40482	–	+
Искра	31230	–	–
Каскад	35924	–	–
Кокинская	35921	–	+
Коралловая	31191	–	–
Костинбродская	29852	–	–
Краснокутская	39384	–	+
Кредо	40731	–	–
Малая Устюжная	8264	–	–
Муза	40734	–	–
Награда	24620	–	–
Новокитаевская	29862	+	+
Ранний Сюрприз	40733	–	–
Ранняя Сладкая	8283	–	+
Самарская Плотная	40730	+	+
Скромница	35478	–	+
Соколенок	40483	–	–
Солнышко	35933	–	+
Спутница	35476	+	+
Суздальская	15014	–	–
Трояна	35931	–	–
Фантазия	35232	–	–

Статистическую обработку полученных данных проводили общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение. По результатам ИФА из 41 сорта малины полевой коллекции RBDV был выявлен у 17 сортов (41,5%). Тестирование на наличие вируса микрорастений тех же сортов из *in vitro*-коллекции не обнаружило инфекции у 9 (52,9%) сортов и выявило RBDV у 8 (47,1%) сортов (табл. 1). Это подтверждает литературные данные о низкой эффективности оздоровления малины от RBDV при использовании только методов культуры *in vitro* [23, 18, 19].

По результатам ИФА отобрали 7 сортов малины из *in vitro* коллекции, зараженные RBDV, а именно: Dormanred, Ottawa, Бальзам, Высокая, Новокитаевская, Самарская Плотная и Спутница. Микрорастения каждого сорта были промаркированы, размножены черенкованием и использованы для проведения опытов по оздоровлению. Маркированные исходные клоны сохраняли в культуре *in vitro* в качестве контроля эффективности противовирусной терапии.

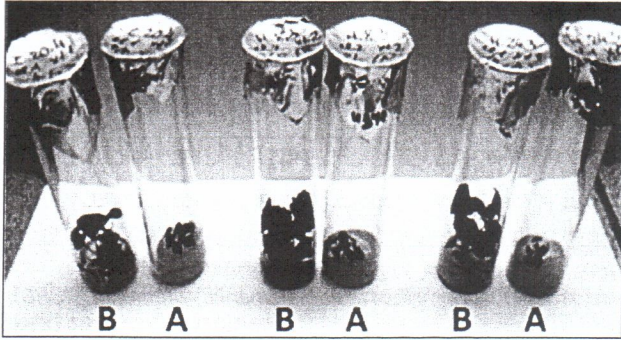


Рис. 1. Внешний вид микрорастений после химиотерапии (1,5 мес.) на питательных средах с рибавирином (А) и РНКазой (В).

В опытах по химиотерапии (схемы А и В) у всех обозначенных сортов было отмечено угнетение роста и развития пробирочных растений на средах с рибавирином. Этот эффект сохранялся в течение длительного времени даже при пассировании микрорастений на питательных средах без препарата. Применение РНКазы обеспечивало лучшее состояние *in vitro* растений, как на этапах проведения химиотерапии, так и на стадии дальнейшего размножения (рис. 1).

При проведении комплексной терапии на обоих вариантах сред (с рибавирином и с РНКазой, схемы С и D соответственно) в условиях повышенной температуры (35°C) много микрорастений погибло. Из-за сравнительно небольшого числа выживших клонов удалось провести только два этапа термообработки, тогда как в вариантах с химиотерапией были выполнены три этапа оздоровления.

Наименьшее число выживших клонов отмечено в варианте с сочетанием термотерапии и использования рибавирина, в котором наблюдали гибель почти половины микрорастений (рис. 2).

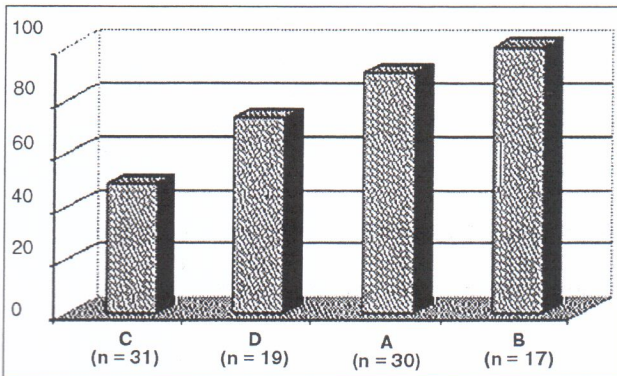


Рис. 2. Выживаемость микрорастений (%) в различных вариантах опытов по оздоровлению сортов малины от RBDV: А – химиотерапия на питательной среде с рибавирином, В – химиотерапия на питательной среде с РНКазой, С – комплексная терапия на питательной среде с рибавирином, D – комплексная терапия на питательной среде с РНКазой; ▨ – процент выживших микрорастений.

Следует также отметить разную чувствительность сортов к действию повышенной температуры. Более термостойкими оказались сорта Dormanred, Новоки-

Литература.

1. Murrant A. F. *Raspberry rings pot and associated diseases of Rubus caused by raspberry ringspot and tomato black ring viruses. // Virus diseases of small fruits / Ed. by Converse R.H. USDA Agriculture Handbook, 1987. V. 631. P. 211-220.*
 2. Daubeny H., Freeman J., Stace-Smith R. *Effects of raspberry bushy dwarf virus on yield and cane growth in susceptible red raspberry cultivars. // Hort Science. 1982. V. 17. P. 645-647.*

таевская, Самарская Плотная. Именно к этим сортам относились все выжившие в варианте С клоны и большинство (83,3%) клонов, сохранившихся в варианте комплексной терапии D.

После завершения опытов по оздоровлению у каждого из 7 сортов малины выжило от 2 до 22 клонов, которые проанализировали методом ИФА на наличие RBDV. Всего было изучено 49 клонов. Микрорастения, свободные от RBDV, выявлены у трех сортов – Dormanred, Самарская Плотная и Новокитаевская. У оставшихся четырех сортов выжили лишь единичные клоны (в двух вариантах химиотерапии – А и В), у которых по результатам ИФА установлено наличие RBDV.

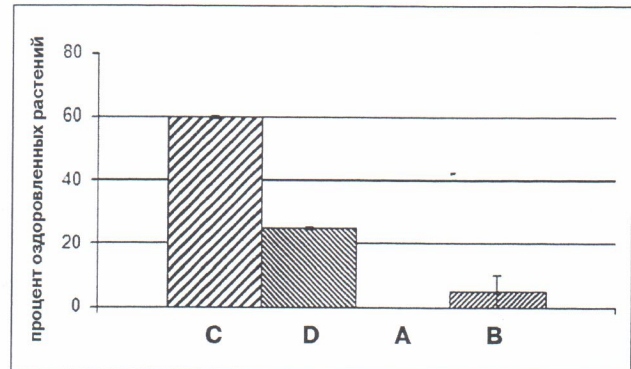


Рис. 3. Эффективность оздоровления микрорастений малины (%) от RBDV с использованием различных вариантов химиотерапии и комплексной терапии: А – химиотерапия на питательной среде с рибавирином, В – химиотерапия на питательной среде с РНКазой, С – комплексная терапия на питательной среде с рибавирином, D – комплексная терапия на питательной среде с РНКазой.

Примененные варианты антивирусной терапии существенно различались между собой по частоте (%) выхода микрорастений, свободных от RBDV (рис. 3). Обработка растений только антивирусными реагентами, без использования повышенной температуры (схемы А и В) оказалась малоэффективной. В подавляющем большинстве случаев оздоровление микрорастений наблюдали после комплексной терапии (сочетание термо- и химиотерапии). При этом использование рибавирина (схема С) давало лучшие результаты, чем применение РНКазы (схема D). Однако именно в варианте с рибавирином и термотерапией наблюдали наиболее высокую гибель микрорастений (см. рис. 2).

Выводы. Применение исключительно химиотерапии для оздоровления малины от RBDV в условиях *in vitro* не эффективно независимо от используемого антивирусного препарата (рибавирин, РНКаза).

Освобождение малины от RBDV происходит при комплексной терапии, сочетающей обработку повышенной температурой (35°C) и химиотерапию с применением рибавирина (30 мг/л). Однако при использовании такого метода наблюдается высокая гибель микрорастений.

Термотерапия с применением РНКазы (0,01%) обеспечивает получение свободных от RBDV клонов с меньшей частотой, но она менее травматична для *in vitro*-растений.

3. Occurrence and distribution of viruses in commercial plantings of *Rubus*, *Ribes* and *Vaccinium* species in Chile. / C. Medina, J.T. Matus, M. Zuniga, C. San-Martin, P. Arce-Johnson // *Chile Inv. Agr.* 2006. V. 33. P. 19–24.
4. Widely prevalent viruses of the United States. Database. URL: <http://www.prevalentviruses.org/subject.cfm?id=56457> (дата обращения: 06.05.2015)
5. First report of Raspberry bushy dwarf virus in *Rubus multibracteatus* from China / C.J. Chamberlain, J. Kraus, P.D. Kohnen, C.E. Finn, R.R. Martin // *Plant Disease*. 2003. V. 87. P. 603.
6. First report of raspberry yellows disease caused by raspberry bushy dwarf virus in Japan / M. Isogai, M. Yoshida, H. Imanishi, N. Yoshikawa // *J. Gen. Plant Pathol.* 2012. V. 78. P. 360–363.
7. Spak J., Kubelkova D. Epidemiology of raspberry bushy dwarf virus in the Czech Republic. // *J. Phytopathol.* 2000. V. 148. P. 371–377.
8. Occurrence and distribution of raspberry bushy dwarf virus in commercial *Rubus* plantations in England and Wales / D. J. Barbara, A. Morton, S. Ramcharan, I.W. Cole, A. Phillips, V.H. Knight // *Plant Pathol.* 2001. V. 50. P. 747–754.
9. Isac V., Isac M., Mladin P. The occurrence of raspberry bushy dwarf virus in raspberry field trials in Romania. // *Acta Hort. (ICHS)*. 2008. V. 780. P. 49–53.
10. Biological, serological and molecular characterisation of raspberry bushy dwarf virus from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis*. / I. Mavrič Pleško, M. Viršček Marn, S. Sirca, G. Urek // *Eur. J. Plant Pathol.* 2009. V. 123. P. 261–268.
11. Jeremović D., Paunović S. Raspberry bushy dwarf virus – a grapevine pathogen in Serbia. // *Pestic. Phytomed. (Beograd)*. 2011. V. 26 (1). P. 55–60.
12. Milusheva S., Koumanov K., Kornov G. First report on identification of raspberry bushy dwarf virus in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) in Bulgaria. // *Third Congress of Virology. Sofia, 2012. Proceedings and Abstract. P. 127–131.*
13. Occurrence of RBDV in Latvia and virus elimination *in vitro* by chemotherapy / N. Pūpola, L. Lepse, A. Kāle, I. Moročko-Bičevska // *Scientific works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture*. 2009. V. 28(3). P. 165–172.
14. Valasevich N., Kukharchyk N., Kvarnheden A. Molecular characterisation of raspberry bushy dwarf virus isolates from Sweden and Belarus. // *Arch Virol.* 2011. V. 156. P. 369–374.
15. Якуб И. А., Евдокименко С. Н. Оценка ремонтантных сортов малины по устойчивости к антракнозу и комплексу вирусов RBDV и TBRV. Материалы X-ой Международной научной конференции «Агроэкологические аспекты устойчивого развития АПК» // Брянск. Изд-во Брянской ГСХА, 2013. С. 202–205.
16. Закономерности распространения вредоносных вирусов в агроценозах малины и земляники садовой / М.Т. Упадышев, К.В. Метлицкая, А.Д. Петрова, К.О. Тихонова // *Инновационные достижения в современном ягодоводстве. Дистанционная международная научно-практическая конференция*. 2015.
17. Murant A. F., Chambers J., Jones A. T. Spread of raspberry bushy dwarf virus by pollination, its association with crumbly fruit and problems of control. // *Ann. Appl. Biol.* 1974. V. 77. P. 271–281.
18. 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.L. Rajamaki, Y. Hiraka, JPT. Valkonen // *Mol Plant Pathol.* 2008. V. 9. №2. P. 237–250.
19. Wang Q. C., Valkonen JPT. Improved recovery of cryotherapy-treated shoot tips following thermotherapy of *in vitro*-grown stock shoots of raspberry (*Rubus idaeus* L.) // *CryoLetters*. 2009. V. 30 №3. P. 171–182.
20. Упадышев М.Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. Москва, 2011. 46 с.
21. Распространенность вирусных болезней плодовых и ягодных культур и современные методы борьбы с ними / М.Т. Упадышев, К.В. Метлицкая, К.О. Тихонова, В.И. Донецких, Г.Ю. Упадышева, И.А. Бъядовский, А.Д. Петрова // *Живые и биокосные системы*. 2014. № 9; URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-22>.
22. Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation / Q.C. Wang, B. Panis, F. Engelmann, M. Lambardi, JPT. Valkonen // *Ann. Appl. Biol.* 2009. V. 154. P. 351–363.
23. Скрининг вируса кустистой карликовости малины методом RT-PCR *in vitro* и в полевом материале / Е.В. Немцова, В.В. Заякин, И.В. Казаков, С.Н. Евдокименко, И.Я. Нам // *С.-х. биология. Сер. Биология растений*. 2007. № 5. С. 119–123.
24. Сохранение вегетативно размножаемых культур *in vitro*- и криоколлекциях: Методические указания / С.Е. Дунаева, Г.И. Пендинен, О.Ю. Антонова, Н.А. Швачко, Н.Н. Волкова, Т.А. Гавриленко // *Под редакцией Гавриленко Т.А. СПб.: ГНУ ВИР Россельхозакад*, 2011. 64 с.
25. Agdia Online Catalog. Reagent Set Compound ELISA, Alkaline Phosphatase label. User guide. URL: <https://orders.agdia.com/Documents/m12.pdf> (дата обращения: 10.05.2014).

IN VITRO IMPROVEMENT OF RASPBERRY VARIETIES FROM RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS (RBDV) USING COMPLEX THERAPY METHOD

O.Y. Antonova, S.E. Dunaeva, Y.V. Ukhatova, N.Y. Kamylyna, N.A. Dolganova, O.V. Lisicyna, T.A. Gavrilenko
Federal Research Center the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Bolshaja Morskaja str., 42-44, Saint-Petersburg, 190000, Russia

Summary. The effect of different antiviral therapy methods on the efficiency of *in vitro* eradication of raspberry bushy dwarf virus (RBDV) was studied. Raspberry plants of 41 selection varieties from VIR collection was tested for RBDV presence by ELISA. Every variety was presented by field plant and its *in vitro* analogue. RBDV was detected in 17 varieties from field collection (41.5 %), for 8 of them RBDV was also detected in *in vitro* plants. We selected microplants of 7 varieties for improvement: Dormanred, Ottawa, Balzam, Vysokaya, Novokitaevskaya, Samarskaya Plotnaya, Sputnitsa. The treatment was carried out using four strategies: chemotherapy on a media with ribavirin (30 mg/L) or with RNase (0.01 %) and a complex therapy which combined the chemotherapy by the same agents and the heat treatment (35deg C). The inhibition of growth and development of microplants of all varieties was observed on the media with ribavirin in compare with that on the media with RNase. The heat treatment also led to inhibition of plants and reduction in their viability. The combination of thermo-therapy with treatment by ribavirin caused the loss almost of half of microplants. Varieties Dormanred, Novokitaevskaya and Samarskaya Plotnaya were the most heat-resistant. Survived clones (from 2 to 22 for each variety, 49 clones in total) were re-tested by ELISA. In the most cases RBDV-free plants were obtained by the complex therapy. The use of ribavirin showed the better results in comparison with RNase (60 % and 25 % of eradicated clones respectively). Chemotherapy without heat treatment was not sufficiently effective; only one eradicated plant was obtained by this method.

Keywords: RBDV, raspberry, thermotherapy, chemotherapy.

Author Details: O.Y. Antonova, Cand. Sc. (Biol.), Leading Researcher (e-mail: olgaant326@mail.ru), S.E. Dunaeva, Cand. Sc. (Biol.), Senior Researcher; Y.V. Ukhatova, Junior Researcher; N.Y. Kamylyna, Junior Researcher; N.A. Dolganova, Reseacher; O.V. Lisicyna, Post-graduate Student; T.A. Gavrilenko, Dr. Sc. (Biol.), Head of Division.

For citation: Antonova O.Y., Dunaeva S.E., Ukhatova Y.V., Kamylyna N.Y., Dolganova N.A., Lisicyna O.V., Gavrilenko T.A. *In vitro* improvement of raspberry varieties from raspberry bushy dwarf virus (rbdv) using complex therapy method. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2015. V.29. №7. pp. 61-64 (In Russ)