

**ВЫДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ОТ ВИРУСОВ
БАЗОВЫХ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ И ГРУШИ С УЧЕТОМ ДИАГНОСТИКИ
*APPLE STEM-PITTING VIRUS (ASPV)***

Н. В. КУХАРЧИК, Е. В. КОЛБАНОВА, Т. Н. БОЖИДАЙ,
М. С. КАСТРИЦКАЯ, О. В. СОЛОВЕЙ

*РУП «Институт плодоводства»,
ул. Ковалева, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: nkykhartchyk@gmail.com*

АННОТАЦИЯ

В результате исследований определен порядок тестирования *Apple stem-pitting virus (ASPV)*, нового в сертификационной схеме для семечковых плодовых культур. Протестированы растения 33 сортов и 6 подвоев яблони на наличие ACLSV, ASGV, ASPV, ArMV. Выделено 35 растений сортов яблони, инфицированных ASPV, процент инфицирования – 28,5 %. Все протестированные подвои яблони свободны от вирусных патогенов. Протестировано 92 образца сортов и подвоев груши. Регламентируемые вирусы (ACLSV, ASGV, ASPV) в образцах не выявлены.

Ключевые слова: яблоня, груша, вирусы, иммуноферментный анализ, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Создание и сохранение базовых (ССЭ, Nuclear stock collection) коллекций основано на выделении свободных от системных патогенов (вирусных, фитоплазменных, бактериальных, вирусоподобных) помологически апробированных сортов плодовых культур, поддержании статуса *virus free* в течение всего срока эксплуатации. Новые научные данные и разработки, совершенствование методов диагностики отдельных патогенов позволяют включать в схему выделения новые патогены, наносящие экономически значимый вред посадкам плодовых культур, регламентируемые ЕРРО и карантинными фитосанитарными требованиями на территории Евразийского экономического союза. Целесообразным является также значительное расширение перечня вовлеченных в работу сортов и культур за счет местного сортимента и сортов собственной селекции.

Для Беларуси новым в сертификационной схеме выделения ССЭ базовых растений является вирус ямчатости древесины яблони (*Apple stem-pitting virus, ASPV*). До 2019 г. ССЭ насаждения яблони и груши не тестировались на наличие этого вируса.

Вирус ямчатости древесины яблони поражает яблоню (*Malus domestica*) и 18 диких видов, грушу (*Pyrus comunitis*) и 16 диких видов, айву (*Cydonia oblonga*).

Идентификация латентных вирусов на клоновых подвоях яблони и груши в условиях Центрально-Черноземной зоны России методами ИФА и ОТ-ПЦР позволила установить, что они заражены вирусом ямчатости древесины яблони в среднем на 14,7 % [1–4]. По многолетним данным, полученным сотрудниками лаборатории вирусологии ФГБНУ ВСТИСП при обследовании 17 насаждений яблони в 6 областях Нечерноземной зоны России, зараженность латентными вирусами составила 50 %, причем сорта зарубежной селекции были заражены на 77 % [5, 6]. Исследования ФГБНУ ВСТИСП базисных маточников яблони показали, что первые 10 лет эксплуатации вирусная инфекция отсутствовала. Первые случаи инфицирования отмечены для вирусов хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV) и мозаики яблони (ArMV). Через 14 лет эксплуатации ACLSV обнаружен у 27 % деревьев, ASGV – у 9,5 %, ASPV – у 4,1 %, ArMV – у 7,0 %. Комплексной инфекцией было заражено 32 % деревьев [7].

При изучении влияния зараженности вирусами на рост и продуктивность яблони А. Н. Тартиновым на Крымской опытной станции было установлено, что вирусы, присутствовавшие в латентной форме, снижают продуктивность сорта Голден Делишес на 20,1–26,1 % [8]. У восприимчивых сортов вирус ямчатости древесины яблони может привести к специфическому бороздчато-ямчатому поражению древесины, поперечному скручиванию листьев, деградации

и отмиранию саженцев. К вирусу ямчатости древесины яблони восприимчивы сорта Голден Делишес, Гранни Смит, Ренет Симиренко [9].

В 2011 г. были проведены исследования по изучению распространенности ASPV в насаждениях яблони в Молдове [10]. Общая площадь обследованных насаждений составляла 75 га. Методом иммуносорбентной электронной микроскопии (ИСЭМ) было протестировано 805 образцов, из которых 122 (14,1 %) были заражены ASPV. Л. Н. Проданюк выявил и идентифицировал вирулентные штаммы вируса ямчатости древесины яблони в Молдове, оптимизировал метод ИФА диагностики этого вируса, предложил и усовершенствовал метод ИСЭМ для диагностики ASPV, подобрал условия и календарные сроки тестирования вируса [11–13].

Обследования яблоневых и грушевых садов Египта и тестирование образцов методом ОТ-ПЦР показало, что процент заражения ASPV составляет 13–17 % [14]. В Корее первые сообщения о зараженности растений яблони вирусом ямчатости уже были в 1973 г., в настоящее время в стране проводятся масштабные молекулярно-генетические исследования вируса [15].

Проверка с помощью метода ОТ-ПЦР семечковых плодовых насаждений Австралии также показала широкое распространение ASPV и ASGV (87,9 % и 69,9 % соответственно). Однако авторы исследования считают, что высокая вариабельность ASPV требует дополнительных исследований на индикаторных растениях и подборе праймеров к наиболее консервативным участкам генома [16].

Изучение генетической вариабельности изолятов ASPV на яблоне и груше проводится в Польше, установлен высокий уровень вариабельности изолятов (70,7–93,5 % на уровне нуклеотидов и 77,8–98,7 % на уровне аминокислот) [17].

В Беларуси исследования по распространению вируса ямчатости древесины яблони показали, что ASPV было заражено 1,5 % от общего количества деревьев (130 шт.), подвергшихся тестированию (ОТ-ПЦР). Проведено клонирование и секвенирование фрагментов геномов вируса ямчатости древесины яблони. На основании оценки степени дивергенции геномов белорусских популяций выявлена их высокая молекулярная вариабельность, обусловленная главным образом однонуклеотидными заменами. Результаты оценки эволюционных отношений белорусских изолятов вируса ямчатости древесины яблони с вирусами из других географических регионов свидетельствуют о генетической разнородности белорусской популяции, отдельные изоляты обладают большей степенью идентичности с последовательностями, выделенными в Индии и Китае, чем с другими последовательностями из Беларуси [18, 19].

Первоначально ASPV был отнесен к кластеровирусам, в дальнейшем молекулярно-биологические исследования продемонстрировали уникальность РНК вируса ASPV в сравнении с геномами других нитеподобных РНК-содержащих вирусов растений и выделили его в 1998 г. в отдельную таксономическую единицу – род *Foveavirus* [20]. В настоящее время вирус относится к роду *Foveavirus*, семейства *Betaflexiviridae*, порядку *Tymovirales* [21].

Вирионы ASPV гибкие, нитеобразные, не имеют суперкапсидной оболочки. Модальная длина вирионов составляет 800 нм, диаметр вирионов – 12–15 нм. Геном ASPV имеет размер 9300 оснований, состоит из одной молекулы одноцепочечной линейной РНК. Инфекция, вызванная ASPV, приводит к цитоплазматическим изменениям в клетке. С помощью электронной микроскопии установлено, что вирусы локализуются в мезофилле или эпидермальной паренхиме инфицированных клеток *Nicotiana occidentalis*. В клетках вирионы могут быть случайно расположены или образуют компактные массы, в том числе кристаллы [20].

Симптомы ямчатости древесины можно наблюдать только на отдельных сортах яблони, и наиболее отчетливо на сорте Вирджиния крэб и ряде других крэбов (Бэти крэб, Флоренс крэб, Хислоп крэб, Кола крэб), а также на сортах Голден Делишес и Маунзен. На древесине ствола появляются различной формы, длины и глубины ямки, которые, в зависимости от штамма вируса, расположены вблизи места прививки или распространяются по всему штамбу, переходя на скелетные ветви зараженных растений. На индикаторе SPY-227 вирус ямчатости вызывает продолговатые трещины в древесине штамба и скелетных ветвей, которые заканчиваются некрозами коры, прогрессирующим усыханием растений. После заражения SPY-227

методом двойной окулировки сильными штаммами вируса на следующий год наблюдаются скручивание листьев верхушками внутрь (эпинастии), торможение роста побегов и быстрое усыхание, начиная с верхушки побега. В случае массивного заражения однолетних саженцев симптомы развиваются медленнее, и отмирание растений наступает постепенно. Сильные штаммы вируса ямчатости древесины вызывают деформацию и складчатость плодов сортов Ренет Симиренко и Вирджиния крэб, измельчение, деформацию и зеленую морщинистость сорта Кола крэб и поражение плодов сортов Первенец Самарканда, Саратони, Регистани [11, 13].

Определенные штаммы вируса ASPV являются возбудителями следующих заболеваний яблони, груши и айвы: отмирание SPY-227 (SPY 227 epinasti and decline), пожелтение жилок груши и красной пятнистости (Pear vein yellow and red mottle), сажистой кольцевой пятнистости айвы (Quince sooty ring spot), каменистости плодов груши (Pear stony pit), зеленой морщинистости плодов яблони (Apple green crinkle). Не исключается вероятность, что некоторые изоляты ямчатости древесины яблони способны вызвать ямчатость древесины на косточковых плодовых культурах [22–25].

Зеленая морщинистость плодов яблони (Apple green crinkle). Симптомы проявляются только на плодах яблони. Через месяц после цветения на завязи появляются многочисленные вмятины и/или выпуклости (бородавки), покрытые грубым, шероховатым эпидермисом, мякоть под ними имеет темно-зеленую окраску и аномальное строение сосудов. Выпуклости и вмятины вызывают сильную деформацию плодов, которые не развиваются и не имеют товарной ценности. При заболевании зеленой морщинистостью распределение пораженных плодов в кроне дерева может быть различным: плоды с симптомами встречаются только на отдельных ветвях или поражено множество плодов на всех ветвях дерева, что, видимо, зависит от времени, прошедшего с момента заражения дерева, чувствительности сорта и агрессивности изолята вируса [22–25].

Пожелтение жилок груши и красная пятнистость листьев груши (Pear vein yellow and red mottle). Заболевание проявляется в хлоротичном окаймлении или крапчатости вдоль мелких вторичных и третичных жилок листьев груши и в значительной степени определяется чувствительностью сорта; возрастом растения (лучше выражены в питомнике и на молодых деревьях в саду); погодными условиями (в годы с жарким и сухим летом симптомы бывают ярче). В конце лета или в начале осени хлоротичная пятнистость на листьях зараженных деревьев меняется на красную крапчатость вдоль жилок [22–25].

Сажистая кольцевая пятнистость айвы (Quince sooty ring spot). Сорта и сеянцы айвы проявляют различную чувствительность к заболеванию. У восприимчивых клонов молодые весенние листья скручиваются верхушками внутрь (эпинастии), затем на кутикуле появляются темный пигмент, окружающий жилки, и хлоротичные пятна [22–25].

Каменистость плодов груши и айвы (Pear stony pit, Quince stony pit). Первые симптомы на плодах груши (*Pyrus domestica*) и айвы (*Cydonia oblonga*) чувствительных сортов появляются уже через 10–20 дней после опадения лепестков, в виде темно-зеленых пятен или колец под эпидермисом. Рост мякоти плода в зоне пятен ограничен, поэтому плоды деформируются и покрываются ямчатостью. Ткани в глубине ямок нередко некротизируются [22–25].

Широкое распространение вируса ямчатости древесины яблони в мире, широкий спектр внешних проявлений патогена и высокая вредоносность, а также отсутствие данных по наличию вируса в республике определили *цель исследований* – оценка распространенности ASPV в насаждениях сортов и подвоев яблони и груши в Беларуси.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в 2019 г. Объект исследований: маточные насаждения сортов и подвоев яблони, маточные насаждения сортов и подвоев (айва) груши; *Apple stem-pitting virus*, *Apple chlorotic leaf spot virus*, *Apple mosaic virus*, *Apple stem-grooving virus*.

Растения тестировали на наличие вирусов DAS-ELISA-тестом с применением реактивов фирмы Bioreba (Швейцария).

Протокол иммуноферментного анализа. Специфические антитела разводили в покровном буфере в соотношении 1:1000 и вносили их в лунки микроплат по 200 мкл, которые затем инкубировали 4 часа при 30 °С. После этого проводили трехкратную промывку промывающим буфером при помощи вошера PW 40 (Bio-Rad, США).

Проводили гомогенизацию растительного материала в индивидуальном пластиковом пакете с добавлением экстрагирующего буфера в соотношении 1:10.

В лунки микроплат вносили экстракт каждого тестируемого образца (по 200 мкл) и оставляли на ночь при температуре +4 °С. На следующий день осуществляли трехкратную промывку с помощью вошера.

Разведенные в конъюгирующем буфере конъюгирующие антитела в соотношении 1:1000 вносили в лунки микроплат по 200 мкл и инкубировали 5 часов при +30 °С, затем проводили трехкратную промывку.

Р-нитрофенилфосфат, растворенный в субстратном буфере, вносили в лунки микроплат и инкубировали при комнатной температуре в темноте.

Регистрация результатов велась на автоматическом ридере iMark (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Сравнивали показатели оптической плотности анализируемых образцов (Ао) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (Ак). Положительными считали образцы, значение оптической плотности у которых превышало среднюю оптическую плотность отрицательного контроля больше чем в 2 раза. Повторность анализа каждого образца двукратная. Для каждой отдельной микроплаты использовали свой положительный и отрицательный контроль.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определен порядок тестирования *Apple stem-pitting virus* (ASPV), нового в сертификационной схеме для семечковых плодовых культур.

Визуальная диагностика ASPV проводится в насаждениях в период активной вегетации в конце весны – начале лета. Наличие симптомов оценивается на листьях, побегах (замедление роста, гибель и некрозы коры и флоэмы, эпинастии листьев, на груше вирус проявляется в пожелтении жилок). В небольших насаждениях (до 1 га) и приусадебных участках осматривается каждое растение, в насаждениях от 1 га до 3 га – 20 % растений, в насаждениях более 3 га – 10 % растений. В многосортных насаждениях осматриваются все сорта отдельно. Обследование не проводится в условиях экстремально жаркой погоды, а также в течение двух недель после длительного периода температур выше +25 °С. Оптимальные сроки тестирования ASPV методом иммуноферментного анализа – май – начало июля (период начала роста побегов и активной вегетации).

Для проведения иммуноферментного анализа отбирают листья в первую очередь с визуальными симптомами, поврежденные вредителями, морфологически аномальные. При отсутствии симптомов листья отбирают с разных сторон кроны со средней части побегов.

Для выделения и подтверждения статуса ССЭ базовых растений в маточно-черенковых насаждениях сортов плодовых культур, форм клоновых подвоев плодовых культур осматривают и отбирают образцы с каждого растения индивидуально.

Отбирают образцы растений (листья) с наиболее свежими и выраженными симптомами, но не полностью погибшие. Каждый образец помещают в отдельный пакет с указанием названия организации, сада, квартала, ряда и места дерева, сорта. Растение, с которого взят образец, этикетуется так, чтобы в дальнейшем возможна была индивидуальная идентификация. Образцы хранят не более 7 дней при температуре +4 °С. Объем образца – 6–8 листьев.

Диагностику вируса проводят методом иммуноферментного анализа, в соответствии с методическими указаниями фирмы производителя антител (наборов для диагностики). Обязательно включение в тесты положительного и отрицательного контролей.

Сравнительная схема диагностики системных патогенов при выделении базовых растений класса А яблони, груши и айвы в Беларуси до 2019 г. и в настоящее время представлена в таблице.

Сравнительная схема диагностики при выделении базовых растений класса А яблони, груши и айвы

Вирусы, фитоплазмы	Яблоня		Груша		Айва	
	до 2019 г.	с 2019 г.	до 2019 г.	с 2019 г.	до 2019 г.	с 2019 г.
<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	+	+	+	+	–	+
<i>Apple mosaic virus</i>	+	+	–	–	–	–
<i>Apple stem-grooving virus</i>	+	+	–	+	–	+
<i>Apple stem-pitting virus</i>	–	+	–	+	–	+
Apple proliferation phytoplasma	–	+	–	–	–	–
Pear decline phytoplasma	–	–	–	+	–	+

Методом DAS-ELISA протестировано 33 сорта яблони (615 тестов); 6 клоновых подвоев яблони (525 тестов). Для тестирования отбирали растения, протестированные в предыдущие годы и свободные от ACLSV, ASGV, ArMV. Тестирование 2019 г. подтвердило отсутствие ранее диагностируемых вирусов в образцах, однако выявило значительное количество растений (35 шт.), инфицированных вирусом ямчатости древесины яблони (ASPV). Инфицированные растения выявлены у сортов: Память Сюбаровой (2 шт.), Арнабель (2 шт.), Айдаред (1 шт.), Ветеран (1 шт.), Найдаред (2 шт.), Редкрафт (6 шт.), Альва (5 шт.), Елена (1 шт.), Папировка Белсад (7 шт.), Чемпион (4 шт.), Папировка (4 шт.). Процент инфицирования растений сортов яблони составил 28,5 %.

В результате исследований выделены 22 сорта яблони, свободные от 4 вирусных патогенов (ACLSV, ASGV, ASPV, ArMV): Айдаред, Аксамит, Алеся, Альва, Антоновка Белсад, Арнабель, Ауксис, Белорусское сладкое, Весялина, Гала, Глостер, Дыямент, Зорка, Имант, Коваленковское, Лигол, Найдаред, Паланэз, Папировка, Редкрафт, Редфри, Слава победителям.

Протестированные подвои яблони (индивидуальные образцы: 54-118 (33 шт.), 62-396 (27 шт.), М9 (32 шт.), М26 (2 шт.), В9 (2 шт.); сборные образцы: 57-545 (220 шт.), М9 (110 шт.)) свободны от 4 регламентируемых вирусных патогенов, в том числе ASPV.

Данный вирус диагностировался в схеме производства оздоровленного посадочного материала в Беларуси впервые и, как показали исследования, явился лимитирующим при фитосанитарном отборе исходных растений сортов яблони.

Тестирование сортов и подвоев груши проводили методом DAS-ELISA на наличие 3 вирусов: ACLSV, ASGV, ASPV. Всего оценено 92 индивидуальных образца сортов и подвоев груши.

Подвои груши С-1 (20 шт.), ВА-29 (20 шт.), 2-31 (15 шт.), 2-7 (14 шт.) и сорта груши Духмяная (4 шт.), Бере Александр Люка (3 шт.), Конференция (3 шт.), Десертная россосанская (3 шт.), Талгарская красавица (3 шт.), Просто Мария (1 шт.), Завяя (3 шт.), Поздняя Белсад (3 шт.) свободны от регламентируемых вирусов.

ВЫВОДЫ

1. Определен порядок тестирования ASPV, нового в сертификационной схеме для семечковых плодовых культур.
2. Протестированы растения 33 сортов и 6 подвоев яблони на наличие ACLSV, ASGV, ASPV, ArMV. Выделено 35 растений сортов яблони, инфицированных ASPV, процент инфицирования – 28,5 %. Все протестированные подвои яблони свободны от вирусных патогенов.
3. Протестировано 92 образца сортов и подвоев груши. Регламентируемые вирусы (ACLSV, ASGV, ASPV) в образцах не выявлены.

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ

1. Саунина, И. И. Вредоносность латентных вирусов на груше и их диагностика методами ИФА и ПЦР : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.11 / И. И. Саунина ; ГНУ ВСТИСП. – М., 2009. – 27 с.
2. Сироткин, Е. Н. Распространенность латентных вирусов на клоновых подвоях яблони в ЦЧ России / Е. Н. Сироткин // АГРО XXI. – 2012. – № 4–6. – С. 19–21.
3. Распространенность вирусных болезней плодовых и ягодных культур и современные методы борьбы с ними / М. Т. Упадышев [и др.] // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9. – С. 22–25.
4. Упадышев, М. Т. Диагностика латентных вирусов семечковых культур в Московской области / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая // Науч. труды ГНУ СКЗНИИСИВ. – 2013. – Т. 2. – С. 75–78.
5. Упадышев, М. Т. Распространенность вредоносных вирусов в насаждениях семечковых культур в Московской области / М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая, А. Д. Петрова // Селекция и сорторазведение садовых культур : материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 170-летию ВНИИСПК, Орел, 2–5 июня 2015 г. / ВНИИСПК ; редкол.: С. Д. Князев [и др.]. – Орел, 2015. – С. 215–217.
6. Упадышев, М. Т. Вирусные болезни и современные методы оздоровления плодовых и ягодных культур : автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук : 06.01.07 / М. Т. Упадышев ; ГНУ ВСТИСП. – М., 2011. – 45 с.
7. Петрова, А. Д. Изучение оптимального срока эксплуатации базисного маточника яблони / А. Д. Петрова, М. Т. Упадышев, К. В. Метлицкая // Современное садоводство [Электронный ресурс]. – М.: ФГБНУ ВСТИСП, 2016. – № 3. – С. 36–41. – Режим доступа: <http://journal-vniispk.ru/article.php?annum=7&number=3>. – Дата доступа: 05.03.2020.
8. Татаринев, А. Н. Вредоносность гуттаперчивости и вирусных болезней яблони / А. Н. Татаринев // Садоводство и виноградарство. – 1994. – № 5–6. – С. 10–11.
9. Бунцевич, Л. Л. Тенденции развития питомниководства в связи с 6-м технологическим укладом / Л. Л. Бунцевич, М. А. Костюк, Ю. П. Данилюк // Плодоводство и виноградарство Юга России [Электронный ресурс]. – Краснодар : СКЗНИИСИВ, 2010. – № 5 (4). – Режим доступа: <http://journalkubansad.ru/archive/5/>. – Дата доступа: 05.03.2020.
10. Вирус ямчатости древесины яблони в Молдове / Ю. Калашян [и др.] // Вестник Киевского национального университета имени Тараса Шевченко. Серия «Биология». – 2012. – № 3 (62). – С. 61–63.
11. Проданюк, Л. Н. Обследование коллекции яблони научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий на наличие вируса ямчатости древесины яблони / Л. Н. Проданюк // Pomicultura, Viticultura și Vinificația. – 2014. – № 3 (51). – Р. 8–9.
12. Проданюк, Л. Н. Диагностика вируса ямчатости древесины яблони методом полимеразно-цепной реакции / Л. Н. Проданюк // Pomicultura, Viticultura și Vinificația. – 2015. – № 5–6. – Р. 42–43.
13. Оценка зараженности сортов и гибридов яблони латентными вирусами в коллекции Научно-практического института садоводства, виноградарства и пищевых технологий / Л. Н. Проданюк [и др.] // Плодоводство и ягодоводство России. – 2013. – Т. 36, № 2. – С. 110–113.
14. Detection and identification of *Apple stem pitting virus* and *Apple stem grooving virus* affecting apple and pear trees in Egypt / S. A. Youssef [et al.] // Julius-Kühn-Archiv : Proceedings of the 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, Neustadt, 5–10 July 2009 / Julius Kühn-Institut ; ed.: W. Jelkmann [et al.]. – Berlin, 2010. – № 427. – P. 248–252.
15. Genetic Diversity of a Natural Population of Apple stem pitting virus Isolated from Apple in Korea / J. Y. Yoon [et al.] // Plant Pathol. J. – 2014. – Vol. 30, № 2. – P. 195–199.
16. Rodoni, B. C. The incidence and strain variation of *apple stem grooving* and *apple stem pitting viruses* in Australian pome fruit / B. C. Rodoni, F. E. Constable // Acta Hort. – 2008. – № 781. – P. 167–174.
17. Sequence diversity and potential recombination events in the coat protein gene of Apple stem pitting virus / B. Komorowska [et al.] // Virus Res. – 2011. – Vol. 158, № 1–2. – P. 263–267.
18. Кузмицкая, П. В. Идентификация вируса ямчатости древесины яблони методом ОТ-ПЦР / П. В. Кузмицкая // Молодежь в науке – 2013 : материалы междунар. науч. конф., Минск, 19–22 ноября 2013 г. / НАН Беларуси ; редкол.: И. В. Вологовский (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2013. – С. 237–239.
19. Kuzmitskaya, P. V. Genetic diversity of Apple stem pitting virus in Belarus / P. V. Kuzmitskaya, O. Y. Urbanovich // Proceedings of the Molecular Phylogenetics : Contributions to the 4th Moscow International Conference «Molecular Phylogenetics» (MolPhy-4), Moscow, 23–26 Sept. 2014 / Moscow State University ; ed.: A. Troitsky [et al.]. – Moscow, 2014. – 36 p.
20. Virus Taxonomy : Classification and nomenclature of viruses // Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / ed.: F. A. Murphy [et al.]. – Vienna, 1995. – Part III. – P. 509–529.
21. Family Flexiviridae: A case study in virion and genome plasticity / G. P. Martelli [et al.] // Annu. Rev. Phytopathol. – 2007. – Vol. 45. – P. 73–100.
22. Detection of Apple stem pitting virus and pear vein yellows virus using reverse transcription-polymerase chain reaction / T. Malinowski [et al.] // Acta Horticultur. – 1989. – Vol. 472. – P. 87–95.
23. Yanase, H. Correlation of pear necrotic spot with pear vein yellows and apple stem pitting and a flexuous filamentous virus associated with them / H. Yanase, H. Koganezawa, P. R. Friedlund // Acta Horticultur. – 1989. – Vol. 235. – P. 157.
24. Бивол, Т. Ф. Изучение латентных вирусов яблони в Молдавской ССР и фитосанитарный отбор как метод получения безвирусного посадочного материала : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / Т. Ф. Бивол ; Молдавск. НИИ садовод., виноградар. и винодел. – Кишинев, 1977. – 35 с.
25. Вердеревская, Т. Д. Вирусные и микоплазменные заболевания плодовых культур и винограда / Т. Д. Вердеревская, В. Г. Маринеску. – Кишинев : Штиинца, 1985. – 311 с.

**ISOLATION OF VIRUS-FREE NUCLEAR STOCK PLANTS OF APPLE AND PEAR CONSIDERING
DIAGNOSTICS FOR *APPLE STEM-PITTING VIRUS* (ASPV)**

N. V. KUKHARCHYK, E. V. KOLBANOVA, T. N. BOZHIDAY, M. S. KASTRITSKAYA, O. V. SOLOVEY

Summary

As a result of the research, the testing procedure for Apple stem-pitting virus (ASPV) was determined. ASPV – new virus in certification scheme for pome fruit crops. 33 apple cultivars and 6 apple rootstocks were tested for the presence of ACLSV, ASGV, ASPV, ApMV. 35 plants of apple cultivars were infected with apple stem-pitting virus; the infection rate was 28.5 %. All tested apple rootstocks are free from viral pathogens. 92 samples of pear cultivars and pear rootstocks were tested. ACLSV, ASGV, ASPV were not detected in the samples.

Keywords: apple, pear, viruses, enzyme-linked immunosorbent assay, Belarus.

Поступила в редакцию 16.04.2020 г.