

УСТАНОВЛЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ACLSV, ASPV В ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ ЯБЛОНИ И ГРУШИ В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ВЕГЕТАЦИИ МЕТОДОМ ИФА

Т. Н. БОЖИДАЙ, Е. В. КОЛБАНОВА, Н. В. КУХАРЧИК

РУП «Институт плодородства»,
ул. Ковалёва, 2, аг. Самохваловичи, Минский район, 223013, Беларусь,
e-mail: kolbanova@tut.by

АННОТАЦИЯ

Установлено различное накопление ACLSV, ASPV в органах растений яблони и груши в различные периоды вегетации методом ИФА. Отмечено наибольшее накопление ASPV в одревесневших побегах в начале апреля и цветках в начале мая, а также отсутствие вируса в листьях яблони и груши в мае. ACLSV в начале вегетации больше всего накапливается в листьях и цветках яблони. Отмечено неоднозначное накопление ASPV в образцах яблони и груши в июне, в июле вирус обнаружен только в образцах яблони (листья, однолетние побеги). ACLSV в июне обнаружен во всех образцах (листья, плоды, однолетние и одревесневшие побеги), в июле отмечено высокое накопление вируса в однолетних побегах яблони. В осенний период отмечено наибольшее накопление ASPV и ACLSV в однолетних побегах.

Ключевые слова: яблоня, груша, вирусы, ACLSV, ASPV, ИФА, Беларусь.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус хлоротической пятнистости листьев яблони (*Apple chlorotic leafspot virus, ACLSV*) является причиной появления круговых, мозаичных узоров как на листьях яблони, так и на листьях других семечковых и косточковых плодовых культур. Для большинства коммерческих сортов яблони вирус не проявляется внешне. Однако на некоторых сортах и культурах отмечены следующие симптомы: прозрачные или хлоротические пятна с ассиметричным нарушением формы листа, линейные узоры на листьях уменьшенного размера, суховершинность, некроз коры [1, 2].

ACLSV переносится при вегетативном размножении, в том числе прививкой, а также нематодами, не распространяется с семенами. Из плодовых и ягодных растений наибольшее распространение вирус получил у яблони, груши, айвы, сливы, вишни и персика [1, 2].

Вирус ямчатости древесины яблони (*Apple stem pitting virus, ASPV*) широко распространен в насаждениях яблони во всем мире, но в основном является латентным вирусом. Симптомы можно наблюдать только на отдельных сортах яблони: 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 [1, 2].

Определенные штаммы ASPV являются возбудителями следующих заболеваний яблони, груши и айвы: отмирание SPY-227 (*SPY 227 epinasti and decline*), пожелтение жилок груши и красная пятнистость (*Pear vein yellow and red mottle*), сажистая кольцевая пятнистость айвы (*Quince sooty ring spot*), каменистость плодов груши (*Pear stony pit*), зеленая морщинистость плодов яблони (*Apple green crinkle*) [3–5].

ASPV распространяется с использованием зараженного материала для размножения [1, 5].

ACLSV и ASPV регламентированы Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений (EPPO) и не допускаются при производстве сертифицированного посадочного материала [1, 6–9]. Также отмечается о встречаемости данных патогенов в Беларуси [1, 10, 11].

Быстрое распространение вирусных болезней в насаждениях многолетних плодовых культур в значительной мере обусловлено большим количеством способов переноса вирусных патогенов между растениями. После заражения растения распространение вируса по органам и тканям и его накопление в растении происходит крайне неравномерно, что приводит к ложноотрицательным результатам при диагностике и, как следствие, дальнейшему распространению вирусов в насаждениях.

Для контроля распространения вирусных заболеваний необходимо осуществлять регулярный мониторинг насаждений. Наличие вирусной инфекции может быть достоверно установлено только лабораторными методами. Основным методом диагностики, применяемым для контроля системных патогенов, является иммуноферментный анализ (ИФА) [2, 12, 13].

Цель исследования – определение особенностей накопления вирусов (ACLSV, ASPV) в органах плодовых культур в различные периоды вегетации методом ИФА.

МЕТОДИКА И МАТЕРИАЛЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в отделе биотехнологии РУП «Институт плодоводства» в рамках задания 1.6.4 «Разработка экологически безопасных методов и технологий поддержания фитосанитарной стабильности агроэкосистем» подпрограммы «Плодородие почв и защита растений» Государственной программы научных исследований «Сельскохозяйственные технологии и продовольственная безопасность», 2021–2025 гг.

Объекты исследований: вирус ямчатости древесины яблони (ASPV); вирус хлоротической пятнистости яблони (ACLSV); деревья яблони сортов Папировка Белсад, Шампион, Редкрафт, Аксамит, Белана, Антоновка; деревья груши сортов Бере Александр Люка, Конференция.

Отбор образцов проводили в различные периоды вегетации. В качестве образцов использовались листья, почки, побеги, цветки, плоды, семена.

Тестирование на наличие ASPV и ACLSV проводили методом DAS-ELISA в соответствии с методическими указаниями фирмы Bioreba (Швейцария) и согласно методике диагностики основных вирусных инфекций плодовых и ягодных культур [14].

Регистрация результатов велась на автоматическом ридере iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad, США) при длине волны 405 нм. Сравнивали показатели оптической плотности анализируемых образцов (A_o) с показателями оптической плотности отрицательного контроля (A_k). Положительными считали образцы, значение оптической плотности у которых превышало среднюю оптическую плотность отрицательного контроля больше чем в 2 раза ($A_o / A_k > 2,0$). Повторность анализа каждого образца двукратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на проведенном сравнительном анализе встречаемости ACLSV, ASPV в насаждениях плодовых культур РУП «Институт плодоводства» (тестирование в 2016–2020 гг.) [11], были отобраны зараженные ACLSV и ASPV объекты с целью дальнейшего изучения и установления накопления этих вирусов в органах растений яблони и груши в различные периоды вегетации методом ИФА.

ASPV. В ходе исследования установлено, что в апреле при использовании в качестве растительных проб почек и одревесневших побегов ASPV был диагностирован у всех трех изучаемых сортов яблони, а также у груши сорта Бере Александр Люка. У груши сорта Конференция ASPV был диагностирован только в одревесневших побегах. Значения оптической плотности у данных образцов превышали среднюю оптическую плотность отрицательного контроля в 2,6–11,6 раза. Использование для анализа одревесневших побегов позволяет диагностировать вирус с наибольшим превышением оптической плотности образцов над отрицательным контролем (в 7,1–11,6 раза), в то время как при использовании почек в качестве образцов превышение оптической плотности образцов над отрицательным контролем было больше в 2,6–6,7 раза.

В начале мая при использовании в качестве растительных проб листьев и цветков ASPV был диагностирован у всех изучаемых сортов яблони и груши только в цветках. Накопление данного вируса в цветках груши значительно больше, чем в цветках яблони. Превышение оптической плотности у образцов цветков груши над отрицательным контролем было больше в 5,0–10,2 раза, в то время как в цветках яблони данное превышение было минимальным – в 2,1–2,3 раза.

В июне при использовании листьев и однолетних побегов в качестве растительных проб ASPV был диагностирован только у яблони сорта Папировка Белсад и Редкрафт, а также у гру-

ши сорта Бере Александр Люка. У яблони сорта Папировка Белсад ASPV был диагностирован только в однолетнем побеге. Значения оптической плотности у данных образцов яблони и груши превышали среднюю оптическую плотность отрицательного контроля в 2,4–5,1 раза.

В июле при использовании листьев и однолетних побегов в качестве растительных проб ASPV был диагностирован только у всех изучаемых сортов яблони. Накопление ASPV в листьях и однолетних побегах груши в июле было ниже порога чувствительности ИФА. Превышение оптической плотности у однолетних побегов яблони над отрицательным контролем было больше в 3,1–7,0 раз, в то время как в листьях яблони данное превышение было ниже – в 2,2–3,6 раза.

В сентябре при использовании листьев в качестве растительных проб ASPV был диагностирован только у груши сорта Бере Александр Люка (Ао / Ак составило 4,4). При использовании образцов, взятых с однолетних побегов, ASPV был диагностирован у всех изучаемых сортов яблони и груши. Значения оптической плотности у данных образцов яблони и груши превышали среднюю оптическую плотность отрицательного контроля в 2,2–7,8 раза. Использование семян позволило диагностировать ASPV только у яблони сорта Чемпион, а также у груши сорта Бере Александр Люка (табл. 1).

Таблица 1. Результаты тестирования на наличие ASPV образцов яблони и груши методом ИФА

Сорт	Ао / Ак										
	апрель		май		июнь		июль		сентябрь		
	почка	одревесневший побег	лист	цветок	лист	однолетний побег	лист	однолетний побег	лист	однолетний побег	семена
Яблоня											
Папировка Белсад	4,4	7,1	2,0	н/т*	1,9	2,4	3,6	7,0	1,6	5,3	н/т
Шампион	2,6	8,0	1,7	2,1	1,7	1,4	2,8	3,1	1,4	5,6	4,6
Редкрафт	4,8	7,5	1,6	2,3	5,1	2,4	2,2	4,0	2,0	5,7	1,7
Груша											
Бере Александр Люка	6,7	11,6	1,2	10,2	2,5	2,9	1,3	1,5	4,4	2,2	3,2
Конференция	1,1	9,4	1,1	5,0	1,0	1,2	1,3	1,6	2,0	7,8	1,5

* н/т – не тестировалось.

Таким образом, оптимальным периодом для диагностики ASPV методом ИФА у яблони является апрель – при использовании одревесневших побегов в качестве растительной пробы; июль и сентябрь – при использовании однолетних побегов в качестве растительной пробы. Диагностику ASPV у груши необходимо проводить в апреле – с использованием одревесневших побегов или в сентябре – с использованием однолетних побегов, когда накопление вируса значительно превышает порог чувствительности ИФА.

ACLSV. В апреле в результате тестирования образцов яблони сорта Белана на наличие ACLSV данный вирус был диагностирован в почках и в одревесневших побегах, у сорта Антоновка – только в одревесневших побегах. У сорта Аксамит данный вирус не был диагностирован ни в почках, ни в побегах.

При использовании в качестве растительных проб листьев и цветков, отобранных в первой декаде мая, ACLSV был диагностирован у всех трех изучаемых сортов яблони. Значения оптической плотности у данных образцов превышали среднюю оптическую плотность отрицательного контроля в 7,0–30,5 раза (табл. 2).

В июне, в ходе тестирования на наличие ACLSV, данный вирус был диагностирован у всех сортов во всех изучаемых образцах, исключение составил только один образец сорта Белана – плод. Наибольшее превышение оптической плотности (в 31,2 раза) было отмечено при использовании плода в качестве образца, но только для яблони сорта Аксамит. Для яблони сортов Белана и Антоновка наибольшее превышение оптической плотности образца над отрицательным контролем (в 7,3 и 6,1 раза соответственно) было отмечено при использовании листьев в качестве растительных проб.

Таблица 2. Результаты тестирования на наличие ACLSV образцов яблони методом ИФА

Сорт	Ао / Ак												
	апрель		май		июнь			июль		сентябрь			
	почка	одревесневший побег	лист	цветок	лист	однолетний побег	одревесневший побег	плод	лист	однолетний побег	лист	однолетний побег	семена
Аксаміт	1,2	1,7	11,5	7,0	3,5	2,8	7,2	31,2	1,8	30,1	1,4	4,6	н/т*
Белана	2,6	6,0	22,3	30,5	7,3	3,5	2,5	1,1	1,6	20,8	1,4	7,4	1,4
Антоновка	1,9	4,8	25,6	30,5	6,1	2,5	2,9	4,6	1,9	30,1	1,4	3,4	1,3

* н/т – не тестировалось.

При использовании в качестве растительных проб листьев и однолетних побегов, отобранных в июле, ACLSV был диагностирован у всех изучаемых сортов яблони в однолетних побегах с высоким превышением оптической плотности образца над отрицательным контролем (в 20,8–30,1 раза).

В сентябре в результате тестирования на наличие ACLSV в образцах яблони, данный вирус был диагностирован у всех сортов только в однолетних побегах. Значения оптической плотности у данных образцов превышали среднюю оптическую плотность отрицательного контроля в 3,4–7,4 раза (табл. 2).

Таким образом, оптимальные сроки диагностики ACLSV у яблони – май и июнь (растительный образец – лист); июль и сентябрь (растительный образец – однолетний побег).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в условиях Беларуси установлено различное накопление ACLSV, ASPV в органах растений яблони и груши в различные периоды вегетации методом ИФА, что позволит увеличить достоверность лабораторной диагностики патогенов и улучшить контроль отбраковки инфицированных маточных растений.

Отмечено наибольшее накопление ASPV в одревесневших побегах в начале апреля и цветках в начале мая, а также отсутствие вируса в листьях яблони и груши в мае. ACLSV в начале вегетации больше всего накапливается в листьях и цветках яблони.

Отмечено неоднозначное накопление ASPV в образцах яблони и груши в июне, в июле вирус обнаружен только в образцах яблони (листья, однолетние побеги).

ACLSV в июне обнаружен во всех образцах (листья, плоды, однолетние и одревесневшие побеги), в июле отмечено высокое накопление вируса в однолетних побегах яблони.

В осенний период отмечено наибольшее накопление ASPV и ACLSV в однолетних побегах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кухарчик, Н. В. Вирусные и фитоплазменные болезни плодовых и ягодных культур в Беларуси / Н. В. Кухарчик. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 209 с.
2. Barba, M. Control of pome and stone fruit virus diseases / M. Barba, V. Iardi, G. Pasquini // Adv. Vir. Res. – 2015. – Vol. 91. – P. 7–83.
3. Molecular and biological characterization of an isolate of Apple stem pitting virus causing pear vein yellows disease in Taiwan / Z.-B. Wu [et al.] // J. Plant Pathol. – 2010. – Vol. 92, № 3. – P. 721–728.
4. Symptoms on apple and pear indicators after back-transmission from *Nicotiana occidentalis* confirm the identity of Apple stem pitting virus with Pear vein yellows virus / G. Leone [et al.] // Acta Horticulturae. – 1998. – Vol. 472. – P. 61–66.
5. Martelli, G. P. Plant Virus Diseases: Fruit Trees and Grapevine / G. P. Martelli, J. K. Uyemoto // Encyclopedia of Virology / ed.: B. W. J. Mahy, M. H. V. Van Regenmortel. – Amsterdam ; Boston, 2008. – P. 201–207.
6. 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.
7. Certification schemes. Pathogen-tested material of *Malus*, *Pyrus* and *Cydonia*. EPPO Standards PM 4/27 // Bull. OEPP/EPPO. – 1999. – Vol. 29. – P. 239–252.
8. Schemes for the production of healthy plants for planting. Certification scheme for cherry. EPPO Standards PM 4/29 // Bull. OEPP/EPPO. – 2001. – Vol. 31. – P. 447–461.

9. Schemes for the production of healthy plants for planting. Certification scheme for almond, apricot, peach and plum. EPPO Standards PM 4/30 // Bull. OEPP/EPPO. – 2001. – Vol. 31. – P. 463–478.

10. Кузмицкая, П. В. Генетическое разнообразие трех вирусов яблони, выделенных в Беларуси / П. В. Кузмицкая, О. Ю. Урбанович // Вавилов. журн. генетики и селекции. – 2016. – Т. 20, № 5. – С. 673–682.

11. Колбанова, Е. В. Сравнительный анализ встречаемости ACLSV, ASPV, PNRSV, PPV в насаждениях плодовых культур / Е. В. Колбанова, Т. Н. Божидай, Н. В. Кухарчик // Плодоводство : сб. науч. тр. / РУП «Ин-т плодоводства» ; редкол.: А. А. Таранов (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2021. – Т. 33. – С. 56–63.

12. Torrance, L. Developments in methodology of plant virus detection / L. Torrance // Neth. J. Plant Pathol. – 1992. – Vol. 98, № 2. – P. 21–28.

13. Webster, C. G. Diagnosis of plant viral pathogens / C. G. Webster // Curr. Sci. – 2004. – Vol. 86, № 12. – P. 1604–1607.

14. Методика диагностики основных вирусных инфекций плодовых и ягодных культур / Н. В. Кухарчик [и др.]. – Минск : А. Н. Вараксин, 2015. – 32 с.

DETERMINATION OF ACCUMULATION ACLSV, ASPV IN THE ORGANS OF APPLE AND PEAR PLANTS IN DIFFERENT PERIODS OF VEGETATION THROUGH ELISA-METHOD

T. N. BOZHIDAI, E. V. KOLBANOVA, N. V. KUKHARCHIK

Summary

Different accumulation of ACLSV, ASPV in the organs of apple and pear plants in different periods of vegetation through ELISA-method was determined. The largest ASPV accumulation was noted in lignified shoots in early April and flowers in early May, as well as the absence of the virus in apple and pear leaves in May. At the beginning of the vegetation period ACLSV accumulates above all in the leaves and flowers of the apple tree. A varying accumulation of ASPV was noted in apple and pear samples in June. In July, the virus was found only in apple samples (leaves, annual shoots). ACLSV was found in all samples in June (leaves, fruits, annual and lignified shoots), in July a high accumulation of the virus was noted in annual shoots of the apple tree. In autumn, the largest accumulation of ASPV and ACLSV was noted in annual shoots.

Keywords: apple tree, pear tree, viruses, ACLSV, ASPV, ELISA, Belarus.

Поступила в редакцию 02.02.2022