

Вироид рубцеватости плодов яблони – фитопатоген плодовых культур

* Башкирова И.Г.¹, Приходько Ю.Н.², Шнейдер Ю.А.³, Лозовая Е.Н.⁴, Живаева Т.С.⁵, Селявкин С.Н.⁶

¹ ORCID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID: 0009-0004-9176-407X,
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

³ ORCID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁴ ORCID: 0000-0001-8612-5127,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁵ ORCID: 0009-0008-8312-2666,
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

⁶ ORCID: 0000-0001-7647-5799,
e-mail: selyavkin91@mail.ru

^{1, 2, 3, 4, 5} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

³ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), г. Москва, Россия, 127434

⁶ Воронежский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (Воронежский филиал ФГБУ «ВНИИКР»), г. Воронеж, Воронежская обл., Россия, 394042

АННОТАЦИЯ

Вироид рубцеватости плодов яблони (*Apescaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd) является одним из особо опасных фитопатогенов, поражающих семечковые и косточковые плодовые культуры. Вироидная инфекция представляет потенциальную опасность, которая может нанести экономический ущерб производству плодовых культур. Наиболее распространенным способом передачи ASSVd является контактная передача (механически через рабочие инструменты), а также через прививку (от зараженного растения к здоровому). В статье приведена краткая обзорная информация по вириду, а также показаны данные по апробации олигонуклеотидов для диагностики ASSVd методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием отечественных реактивов.

Проверку работы олигонуклеотидов осуществляли с помощью отечественных наборов реагентов компании ООО «НПФ Синтол» и ЗАО «Евроген». Для проведения экспериментов по оценке специфичности праймеров использовали различные изоляты близкородственных виридов из семейств Avsunviroidae и Pospiviroidae. В данной работе проведен анализ олигонуклеотидов с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST. В исследовании проведено множественное выравнивание нуклеотидных

Apple scar skin viroid – fruit crops phytopathogen

* Ida G. Bashkirova¹, Yuri N. Prihodko², Yuri A. Shneyder³, Evgenia N. Lozovaya⁴, Tatiana S. Zhivaeva⁵, Sergey N. Selyavkin⁶

¹ ORCID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID: 0009-0004-9176-407X,
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

³ ORCID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁴ ORCID: 0000-0001-8612-5127,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁵ ORCID: 0009-0008-8312-2666,
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

⁶ ORCID: 0000-0001-7647-5799,
e-mail: selyavkin91@mail.ru

^{1, 2, 3, 4, 5} All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU «VNIICR»), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

³ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, 127434

⁶ Voronezh Branch of FGBU "VNIICR", Voronezh, Voronezh Oblast, Russia, 394042

ABSTRACT

Apple scar skin viroid, ASSVd (*Apescaviroid cicatricimali*) is a particularly dangerous phytopathogen affecting pome and stone fruit crops. Viroid infection poses a potential threat that can cause economic damage to fruit production. The most common pathways of ASSVd are contact (mechanically through tools) and grafting (from an infected plant to a healthy one). This article provides a brief overview of the viroid and presents data on the validation of oligonucleotides for ASSVd diagnostics with real-time PCR using Russian reagents.

Oligonucleotide performance was tested using Russian Syntol and Evrogen reagent kit. Various isolates of closely related viroids from the Avsunviroidae and Pospiviroidae families were used to conduct experiments assessing primer specificity. In this study, oligonucleotide analysis was performed using the NCBI Primer-BLAST online service. Multiple nucleotide sequence alignments of apple fruit scarring viroid isolates were performed using

последовательностей изолятов вириода рубцеватости плодов яблони с помощью специальных программ MAFFT и AliView. Биоинформатически проанализированы видоспецифичные олигонуклеотиды на возможность образования вторичных структур – шпилек и димеров, которые могут повлиять на диагностику фитопатогена. Установлено, что праймеры cASSVd/hASSVd и ASS-F/ASS-R способны образовывать большое количество вторичных структур, которые могут привести к ложноположительному результату. С помощью праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291, ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P возможно идентифицировать вириод рубцеватости плодов яблони методом ПЦР-РВ.

Ключевые слова. *Apescaviroid cicatricimali*, ASSVd, семечковые культуры, косточковые культуры, карантин растений.

ВВЕДЕНИЕ



реди различных фитопатогенов плодовых культур особое положение занимают вириоды. Вириоды – это инфекционные патогены, состоящие из одноцепочечной кольцевой РНК, которые вызывают различные болезни растений, нанося огромный экономический

ущерб. Поскольку эти патогены не кодируют белки, они используют белки растения-хозяина для выполнения всех своих основных функций, включая репликацию, транспортировку и патогенез. Вириоды передаются вегетативным размножением/прививкой и механической инокуляцией, например, через использование загрязненных лезвий во время обрезки и прививки (Diener, 2001; Walia et al., 2014; Приходько и др., 2021; Tian et al., 2022).

Для семечковых плодовых культур особое значение имеет вириод рубцеватости плодов яблони (*Apescaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd), который является типовым видом рода *Apescaviroid* семейства Pospiviroidae (EPPO Global Database, 2025). Вириод вызывает болезни рубцеватости плодов (scar skin) яблони, пятнистости плодов яблони (dapple apple), ямчатости плодов груши (pear fruit dimple), ржавой кожицы плодов груши (pear rusty skin), морщинистости плодов груши (pear fruit crinkle) (Walia et al., 2012; Hadidi et al., 2017; Tian et al., 2022).

Первые сообщения о болезни рубцеватости плодов яблони появились в 1930-х гг. в Китае. Инфекция привела к серьезным потерям урожая в Китае в 1950-х гг., особенно в районе Ляодунского полуострова, где были поражены тысячи деревьев, а плоды яблони перестали продаваться из-за нетоварного внешнего вида. Болезнь повлияла на выращивание основного сорта яблони в Китае – Red Fuji. В некоторых провинциях Шаньси, Шэньси и Хэбэй более 50% деревьев были поражены этой болезнью (Liu et al., 1957; Hadidi et al., 2017). В 1953 г. в Китае болезнь была описана и получила название Manshu-sabika-byo (болезнь побурения плодов маньчжурской яблони), или Sabika (болезнь маньчжурской яблони), по

specialized MAFFT and AliView software. Species-specific oligonucleotides were bioinformatically analyzed for the formation of secondary structures—hairpins and dimers—that may affect the diagnosis of the phytopathogen. It was found that the cASSVd/hASSVd and ASS-F/ASS-R primers are capable of forming a large number of secondary structures, which can lead to false-positive results. Using the primers ASSVd-F91/ASSVd-R291, ASS-F/ASS-R and the probe ASS-P, it is possible to identify the apple fruit scarring viroid using the real-time PCR method.

Key words. *Apescaviroid cicatricimali*, ASSVd, pome crops, stone fruit crops, plant quarantine.

INTRODUCTION



mong the various phytopathogens of fruit crops, viroids occupy a special position. Viroids are infectious pathogens consisting of single-stranded circular RNA that cause various plant diseases, causing

enormous economic losses. Since these pathogens do not encode proteins, they utilize host plant proteins to perform all their essential functions, including replication, transport, and pathogenesis. Viroids are transmitted by vegetative propagation/grafting and mechanical inoculation, for example, through the use of contaminated blades during pruning and grafting (Diener, 2001; Walia et al., 2014; Prikhodko et al., 2021; Tian et al., 2022).

Apple scar skin viroid is of particular importance for pome fruit crops (*Apescaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd), which is the type species of the genus *Apescaviroid* of the family Pospiviroidae (EPPO Global Database, 2025). The viroid causes apple scar skin, dapple apple, pear fruit dimple, pear rusty skin, pear fruit crinkle (Walia et al., 2012; Hadidi et al., 2017; Tian et al., 2022).

The first reports of ASSVd appeared in China in the 1930s. The infection caused severe crop losses in China in the 1950s, particularly in the Liaodong Peninsula region, where thousands of trees were affected, and the apple fruit became unmarketable due to its unmarketable appearance. The disease impacted the cultivation of China's main apple variety, Red Fuji. In some provinces of Shanxi, Shaanxi, and Hebei, more than 50% of trees were affected by this disease (Liu et al., 1957; Hadidi et al., 2017). In 1953, the disease was described in China and named "Manshu-sabika-byo" (Manchurian apple browning disease) or "Sabika" (Manchurian apple disease), based on the results of experiments on viroid transmission through grafting (Ohtsuka, 1935;

результатам экспериментов по передаче вириода через прививку (Ohtsuka, 1935; Ohtsuka, 1938; Walia et al., 2014). Также в 1950-х гг. в яблонево-м саду (штат Нью-Гэмпшир, США) была отмечена болезнь пятнистости плодов яблони, позже она наблюдалась в Великобритании, Китае и Японии (Lee et al., 2001; Hadidi et al., 2017).

Затем, в 1953 г., появились сообщения о болезни плодовых в префектуре Нагано (Япония), а в 1970-х гг. эта болезнь наблюдалась и в других основных районах выращивания яблонь в Японии (Hadidi et al., 2017). Симптомы болезни проявлялись лишь на плодах; на листьях и стволах деревьев симптомов заражения не было (Takahashi, 1987). В 1960–1962 гг. в Китае отмечалось, что около 90% деревьев груш были поражены болезнью (Liu et al., 1962).

Изначально считалось, что возбудителем болезней является вирус из-за его способности передаваться через трансплантат (Koganezawa, 1985). И только в 1980-х гг. была выдвинута гипотеза о вириодной этиологии данных болезней (Walia et al., 2012).

Предполагается, что первичный ареал ASSVd находится в Северо-Восточной Азии (Китай и Япония), где он наиболее широко распространен. А его ограниченное распространение в странах Европы и Америки является результатом первоначальной интродукции коммерческих сортов плодовых культур из вышеупомянутых азиатских стран (Kyriakopoulou, Hadidi, 1997). Груша миндалевидная на протяжении многих веков произрастает в горах Греции, и ранее ее семена широко использовались для получения семенных подвоев с целью последующей прививки культурных сортов груши и айвы. Присутствие ASSVd в растениях груши в горах, вдали от любого вмешательства человека, позволяет предположить, что вириод является родным для Греции. В связи с этим не исключена возможность, что Греция, расположенная в Средиземноморском регионе, является вторым центром происхождения вириода. Очевидно, инфицирование растений происходило с помощью зараженного материала через прививку (Kyriakopoulou, Hadidi, 1997; Kyriakopoulou et al., 2001). Позднее данный вириод был выявлен на культивируемых и дикорастущих растениях черешни в Греции (Kaponi et al., 2013).

Геном вириода рубцеватости плодов яблони был секвенирован в 1987 г. и представляет собой одноцепочечную кольцевую РНК, состоящую из 330 нуклеотидов (Hashimoto, Koganezawa, 1987).

Основным растением-хозяином для вириода является яблоня обыкновенная (*Malus domestica* (Suckow) Borkh). Помимо яблони, вириод инфицирует и другие растения из семейства Rosaceae: яблоня дикая (*M. sylvestris* (L.) Mill.), груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.), груша миндалевидная (*P. amygdaliformis* Vill.), белая китайская груша (*P. bretschneideri* Rehder), груша грушелистная (*P. pyrifolia* (Burm.f.) Nak.), груша уссурийская (*P. ussuriensis* Maxim.), персик (*Prunus persica* (L.) Batsch), абрикос (*P. armeniaca* L.), черешня (*P. avium* L.), гималайская вишня (*P. cerasoides* D. Don) (Walia et al., 2012; Walia et al., 2014; Kaponi et al., 2024; CABI, 2025).

Ohtsuka, 1938; Walia et al., 2014). Also, in the 1950s, apple fruit spot disease was noted in an apple orchard (New Hampshire, USA), and later it was observed in the UK, China, and Japan (Lee et al., 2001; Hadidi et al., 2017).

Then, in 1953, reports of the disease appeared in Nagano Prefecture, Japan, and in the 1970s, the disease was observed in other major apple-growing areas of Japan (Hadidi et al., 2017). Symptoms of the disease appeared only on the fruits; there were no symptoms of infection on the leaves or trunks of the trees (Takahashi, 1987). In China, between 1960 and 1962, it was noted that about 90% of pear trees were affected by the disease (Liu et al., 1962).

Initially, it was believed that the causative agent of the diseases was a virus, due to its ability to be transmitted through a transplant (Koganezawa, 1985). It was only in the 1980s that the hypothesis of a viroid etiology of these diseases was put forward (Walia et al., 2012).

The primary distribution of ASSVd is believed to be in Northeast Asia (China and Japan), where it is most widespread. Its limited distribution in Europe and America is the result of the initial introduction of commercial fruit varieties from the aforementioned Asian countries (Kyriakopoulou and Hadidi, 1997). The almond-shaped pear has been grown in the mountains of Greece for centuries, and its seeds were previously widely used to produce seed rootstocks for subsequent grafting of cultivated pear and quince varieties. The presence of ASSVd in pear plants in the mountains, far from any human intervention, suggests that the viroid is native to Greece. Therefore, the possibility cannot be ruled out that Greece, located in the Mediterranean region, is a second center of origin for the viroid. Apparently, the plants were infected by grafting contaminated material (Kyriakopoulou and Hadidi, 1997; Kyriakopoulou et al., 2001). Later, this viroid was detected on cultivated and wild cherry plants in Greece (Kaponi et al., 2013).

The genome of ASSVd was sequenced in 1987 and is a single-stranded circular RNA consisting of 330 nucleotides (Hashimoto, Koganezawa, 1987).

The main host plant for ASSVd is the common apple tree (*Malus domestica* (Suckow) Borkh). Apart from apple trees, the viroid also infects other plants from the Rosaceae family: *M. sylvestris* (L.) Mill., *Pyrus communis* L., *P. amygdaliformis* Vill., *P. bretschneideri* Rehder, *P. pyrifolia* (Burm.f.) Nak., *P. ussuriensis* Maxim., *Prunus persica* (L.) Batsch, *P. armeniaca* L., *P. avium* L., *P. cerasoides* D. Don (Walia et al., 2012; Walia et al., 2014; Kaponi et al., 2024; CABI, 2025).

ASSVd has been detected in various apple tissues: leaves, stems, peel, fruit pulp, rootstocks, and roots. However, symptoms of viroid infection appear only on the fruit, not on the leaves and stems. Stunting of plant growth is the primary symptom of most viroid diseases (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Hurtt, Podleckis, 1995; Desvignes et al., 1999; Kim et al., 2010; Walia et al., 2014; Li et al., 2023).

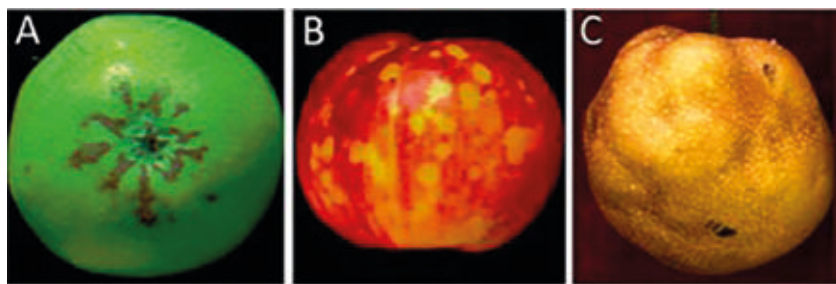


Рис. 1. Симптомы: А – коричневая рубцеватость на плодах яблоки; В – бледные пятна на коже плодов яблоки; С – ямчатость на плодах груши (Di Serio et al., 2018)

Fig. 1. Symptoms: A) Brown scarring on apple fruit; B) Pale spots on apple fruit skin; C) Pear fruit crinkle (Di Serio et al., 2018)

ASSVd был обнаружен в различных тканях яблоки: в листьях, стеблях, кожуре, мякоти плодов, подвоях и корнях. Однако симптомы заражения виroidом проявляются только на плодах, но не проявляются на листьях и стеблях. Задержка роста растений является основным симптомом большинства виroidных болезней (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Hurtt, Podleckis, 1995; Desvignes et al., 1999; Kim et al., 2010; Walia et al., 2014; Li et al., 2023).

Например, во Франции (1995–1998 гг.) были проведены опыты по искусственному заражению ASSVd 42 коммерческих сортов яблоки. По результатам чувствительности к виroidу выделено несколько групп основных сортов яблоки: толерантные (Baujade, Belrène, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, Pink Lady, Reine des Reinettes, Reinette Grise du Canada, Smoothee), слабовосприимчивые (Akane, Ambassy, Delbarestivale, Fuji и мутанты Fuji, Gala и мутанты Gala, Redwinter, Spurkoop), восприимчивые (Delbard Jubilé, Elstar и мутанты Elstar, Festival, Querina, Sunris), более восприимчивые (Ace, Charden, Early Red One, Red Chief, Red Delicious, Starkrimson), высоковосприимчивые (Belchard, Braeburn, Hillwell и мутанты Hillwell, Indo). На толерантных сортах лишь на отдельных плодах развивались неотчетливые пятна или слабое изменение окраски. На слабовосприимчивых и восприимчивых сортах у части плодов развивалась пятнистость слабой или умеренной интенсивности. На более восприимчивых сортах почти все плоды изменяли окраску или имели пятна, а у семенной чашечки развивались ржавые опробковевшие пятна. На высоковосприимчивых сортах развивались интенсивные симптомы рубцеватости, растрескивания и некротизации плодов, которые утрачивали товарные качества (Desvignes et al., 1999).

ASSVd в естественных условиях поражает исключительно древесные растения, в первую очередь семечковые и косточковые плодовые деревья. Однако виroid имеет широкий круг экспериментальных растений-хозяев: огурец (*Cucumis sativus* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.), баклажан (*S. melongena* L.), горох (*Pisum sativum* Lam.), фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.), табак (*Nicotiana benthamiana* Domin, *N. tabacum* L., *N. glutinosa* L.), киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.), марь (*C. amaranticolor* D. Don). Возможность заражения этих растений в природных условиях не изучалась (Walia et al., 2014; Walia et al., 2015; Lodh, 2017).

For example, in France (1995–1998), experiments were conducted on artificial infection of 42 commercial apple varieties with ASSVd. Based on the results of susceptibility to the viroid, several groups of main apple varieties were distinguished: tolerant (Baujade, Belrène, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, Pink Lady, Reine des Reinettes, Reinette Grise du Canada, Smoothee), slightly susceptible (Akane, Ambassy, Delbarestivale, Fuji and Fuji mutants, Gala and Gala mutants, Redwinter, Spurkoop), susceptible (Delbard Jubilé, Elstar and Elstar mutants, Festival, Querina, Sunris), more susceptible (Ace, Charden, Early Red One, Red Chief, Red Delicious, Starkrimson), highly susceptible (Belchard, Braeburn, Hillwell and Hillwell mutants, Indo). On tolerant varieties, only a few fruits developed indistinct spots or mild discoloration. On slightly susceptible and susceptible varieties, some fruits developed mild to moderate spotting. On more susceptible varieties, almost all fruits showed discoloration or spots, and rusty, corky spots developed on the calyx. On highly susceptible varieties, severe scarring, cracking, and necrosis of the fruits developed, rendering them unmarketable (Desvignes et al., 1999).

ASSVd naturally infects exclusively woody plants, primarily pome and stone fruit trees. However, the viroid has a wide range of experimental host plants: *Cucumis sativus* L., *Solanum lycopersicum* L., *S. melongena* L., *Pisum sativum* Lam., *Phaseolus vulgaris* L., *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. tabacum* L., *N. glutinosa* L., *Chenopodium quinoa* Willd., *C. amaranticolor* D. Don. The possibility of infection of these plants in natural conditions has not been studied (Walia et al., 2014; Walia et al., 2015; Lodh, 2017).

When infected with ASSVd, pale spots form on the skin of apple fruit (see Fig. 1-B). The surface of the



Рис. 2. Симптомы заражения ASSVd на незрелом яблоке из района Олимпия на Пелопоннесе, Греция (Kaponi et al., 2024)

Fig. 2. Symptoms of ASSVd infection on an unripe apple from the Olympia region of the Peloponnese, Greece (Kaponi et al., 2024)

При заражении виридом рубцеватости плодов яблони образуются бледные пятна на коже плодов яблони (см. рис. 1, В). Поверхность пятен может покрываться красно-бурой или коричневой опробковевшей тканью, которая в виде полос или целых секторов распространяется по плоду (см. рис. 1, А, рис. 3). Пятна часто растрескиваются (см. рис. 2). Зараженные плоды часто остаются

мелкими и жесткими, плохо вызревшими и имеют неприятный вкус. Симптомы заражения на плодах груши проявляются в виде ямчатости (морщинистости) кожицы (см. рис. 1, С). Симптомы на плодах яблони обычно не сопровождаются наличием каких-либо симптомов на листьях. Вириод может иметь длительный латентный период в своих растениях-хозяевах (Shamloul et al., 2004; Sipahioglu et al., 2009; Hadidi et al., 2017; Di Serio et al., 2018; Kaponi et al., 2024).

Apple scar skin viroid снижает товарный вид плодов яблони (уменьшение размера, образование рубцов, неравномерное окрашивание кожуры), что негативно сказывается на производстве фруктов (Diener, 1971; Li et al., 2023). Заражение виридом может привести к значительным экономическим потерям и снижению урожайности.

В настоящее время ASSVd распространен в странах Азии (Индия, Иран, Китай, Республика Корея, Япония), Европы (Великобритания, Греция, Дания, Италия, Польша, Турция, Франция), Северной Америки (Канада, США), Южной Америки (Аргентина) (CABI/EPPO, 2025).

Вириод является одним из наиболее опасных возбудителей болезней плодовых культур в Китае и Японии, хотя в большинстве стран – производителей яблок фитопатоген встречается относительно редко (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Desvignes et al., 1999). В основных регионах производства яблонь в Китае инфекционная нагрузка виридом колеблется от 4,8 до 48,6% (Li et al., 2023). Симптомы заражения виридом наблюдались в Республике Корея на нескольких сортах яблони (Kim et al., 2006). В Южной Корее ASSVd широко распространен на сортах яблони Sansa, Fuji, Chukwang, Miki-Life, Hongro и Songbongum на юге страны, вызывая на них пятнистость плодов (Kwon et al., 2002). В большинстве районов выращивания яблонь в штате Химачал-Прадеш (Индия) уровень заражения ASSVd составил 27,6% в 2012 г., что является самым высоким показателем среди исследуемых виридных и вирусных патогенов семечковых культур, распространенных в этих районах (Kumar et al., 2012). Вириод выявляли на растениях яблони сорта Golden Delicious и груши сорта Dargazi в провинции Хорасан-Резави (Иран) (Yazarlou et al., 2012). Также



Рис. 3. Коричневая рубцеватость на плодах яблони (Sipahioglu et al., 2009)

Fig. 3. Brown scar skin on apple fruit (Sipahioglu et al., 2009)

spots may become covered with a reddish-brown or brown corky tissue, which spreads across the fruit in stripes or entire sectors (see Fig. 1-A, Fig. 3). The spots often crack (see Fig. 2). Infected fruits often remain small and tough, do not ripen well, and have an unpleasant taste. Symptoms of infection on pear fruit appear as pitting (wrinkling) of the skin (see Fig. 1-C). Symptoms on apple fruit are usually not accompanied by any symptoms on the leaves. The viroid can have a long latent period in its host plants (Shamloul et al., 2004; Sipahioglu et al., 2009; Hadidi et al., 2017; Di Serio et al., 2018; Kaponi et al., 2024).

ASSVd reduces the marketability of apple fruits (size reduction, scarring, uneven peel coloring), which negatively impacts fruit production (Diener, 1971; Li et al., 2023). Viroid infection can lead to significant economic losses and reduced yields.

Currently, ASSVd is widespread in Asian countries (India, Iran, China, Republic of Korea, Japan), Europe (Great Britain, Greece, Denmark, Italy, Poland, Turkey, France), North America (Canada, USA), South America (Argentina) (CABI/EPPO, 2025).

Viroid is one of the most important pathogens of fruit crops in China and Japan, although in most apple-producing countries the phytopathogen is relatively rare (Hashimoto and Koganezawa, 1987; Desvignes et al., 1999). In the main apple-producing regions of China, the viroid infection load ranges from 4.8 to 48.6% (Li et al., 2023). Symptoms of viroid infection have been observed in the Republic of Korea on several apple varieties (Kim et al., 2006). In South Korea, ASSVd is widespread on Sansa, Fuji, Chukwang, Miki-Life, Hongro, and Songbongum apple varieties in the south of the country, causing fruit spotting (Kwon et al., 2002). In most apple-growing areas of Himachal Pradesh, India, the ASSVd infection rate was 27.6% in 2012, which is the highest among the studied viroid and viral pathogens of pome crops common in these areas (Kumar et al., 2012). The viroid was detected on Golden Delicious apple and Dargazi pear plants in Razavi Khorasan Province, Iran (Yazarlou et al., 2012). ASSVd is also widespread in the Eastern Anatolia Region, Turkey (Sipahioglu et al., 2009).

ASSVd широко распространен в регионе Восточной Анатолии (Турция) (Sipahioglu et al., 2009).

Сведения о фитосанитарном статусе вириода представлены в таблице.

Основным путем распространения ASSVd является инфицированный посадочный материал восприимчивых растений-хозяев, так как этот патоген легко переносится на здоровые растения при прививке на них зараженных черенков или почек, а также рабочий инструмент – загрязненный соком растения секатор (Heo et al., 2019; Li et al., 2023). Отмечено, что в низкой степени возможна передача вириода через семена зараженных деревьев (Hurt, Podleckis, 1995; Kim et al., 2006; Walia et al., 2015). Было установлено, что передача вириода может осуществляться насекомым-переносчиком – тепличной белокрылкой (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) и табачной белокрылкой (*Bemisia tabaci* Genn.) (Walia et al., 2015; Lodh, 2017; Tian et al., 2022).

На размножение ASSVd существенное влияние оказывает температура. Например, при инокуляции экспериментальных растений-хозяев симптомы заражения появлялись при температуре от 20 до 30 °C (Walia et al. 2014).

Information on the phytosanitary status of the viroid is presented in the table.

The main pathway of ASSVd spread is infected planting material from susceptible host plants, as this pathogen is easily transferred to healthy plants by grafting infected cuttings or buds onto them, as well as by working tools - pruning shears contaminated with plant sap (Heo et al., 2019; Li et al., 2023). It has been noted that, to a low degree, transmission of the viroid is possible through the seeds of infected trees (Hurt and Podleckis, 1995; Kim et al., 2006; Walia et al., 2015). It has been established that transmission of the viroid can be carried out by an insect vector – *Trialeurodes vaporariorum* Westwood and *Bemisia tabaci* Genn (Walia et al., 2015; Lodh, 2017; Tian et al., 2022).

Temperature has a significant impact on ASSVd reproduction. For example, when inoculating experimental host plants, infection symptoms appeared at temperatures between 20°C and 30°C (Walia et al. 2014).

Табл. 1. Фитосанитарный статус вириода рубцеватости плодов яблони (EPPO Global Database, 2025)

Table. Phytosanitary status of ASSVd (EPPO Global Database, 2025)

Страна Country	Статус Status	Год включения в Перечень КВО Year of inclusion in Quarantine Pest List
Канада Canada	Карантинный вредный организм Quarantine pest	2019
Израиль Israel	Карантинный вредный организм Quarantine pest	2009
Иордания Jordan	Список A1 List A1	2013
Швейцария Switzerland	Регулируемый некарантинный вредный организм Regulated non-quarantine pest	2019
Великобритания United Kingdom	Регулируемый некарантинный вредный организм Regulated non-quarantine pest	2020
ЕС EU	Регулируемый некарантинный вредный организм (приложение IV) Regulated non-quarantine pest (Appendix IV)	2019

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали следующие референсные изоляты вириодов из коллекции DSMZ (Германия): латентной мозаики персика (PLMVd PC-1134), рубцеватости плодов яблони (ASSVd PC-1136), пузырчатого рака коры груши (PBCVd PC-1135), экзокортиса цитрусовых (CEVd PV-0942; CEVd PV-1163), карликовости верхушек томата (TASVd PV-1151, TASVd PV-0971), латентный вириод колумнеи (CLVd PV-1068), мелкоплодности перца (PCFVd PC-1181, PCFVd PV-1067), карликовости хризантем (CSVd PC-0735), хлоротичной карликовости томата (ToCDVd PV-1148, ToCDVd PC-0916), веретеновидности клубней картофеля (PSTVd PV-0860); а также изоляты вириода веретеновидности клубней картофеля (PSTVd VIZR-07, ФГБУ «ВНИИКР») и вириода желтой крапчатости винограда (GYSVd Syn-10, ООО «Синтол»). Все вышеперечисленные изоляты использовались для оценки специфичности анализируемых праймеров.

MATERIALS AND METHODS

The following reference isolates of viroids from the DSMZ collection (Germany) were used in the studies: Peach latent mosaic viroid (PLMVd PC-1134), Apple Scar Skin Viroid (ASSVd PC-1136), Pear blister canker disease (PBCVd PC-1135), Citrus exocortis viroid (CEVd PV-0942; CEVd PV-1163), Tomato apical stunt viroid (TASVd PV-1151, TASVd PV-0971), Columnea latent viroid (CLVd PV-1068), Pepper chat fruit viroid (PCFVd PC-1181, PCFVd PV-1067), Chrysanthemum Stunt Viroid (CSVd PC-0735), Tomato Chlorotic Dwarf Viroid (ToCDVd PV-1148, ToCDVd PC-0916), Potato spindle tuber viroid (PSTVd PV-0860); as well as isolates of potato spindle tuber viroid (PSTVd VIZR-07, FGBU "VNIIEKR") and Grapevine yellow speckle viroid (GYSVd Syn-10,

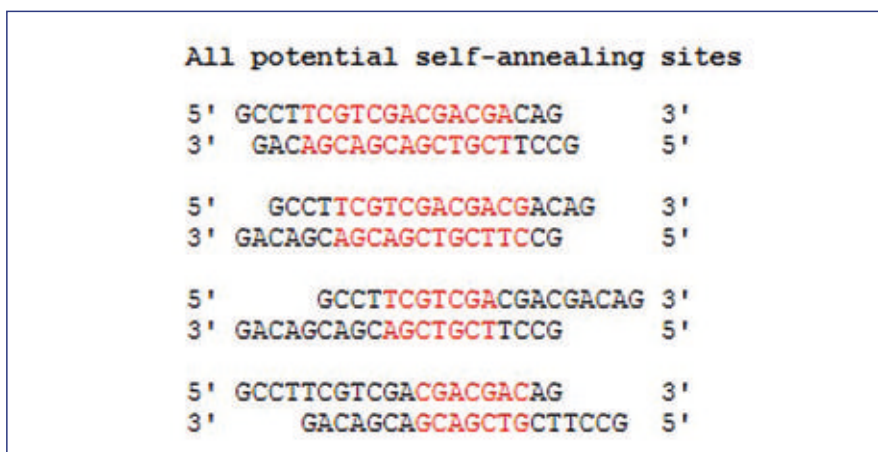


Рис. 4. Вариант вторичных структур для праймеров cASSVd/hASSVd, интерфейс Oligonucleotide Properties Calculator (фото авторов)

Fig. 4. Secondary structure variant for cASSVd/hASSVd primers, Oligonucleotide Properties Calculator (photo by the authors)

Выделение РНК исследуемых изолятов осуществляли с помощью набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Для идентификации вириода рубцеватости плодов яблони методом ПЦР-РВ использовали следующие олигонуклеотиды: cASSVd/hASSVd (Di Serio et al., 2002), ASSVd-F91/ASSVd-R291 (Bae, 2015; Bak et al., 2017), ASSVd-F/ASSVd-R/ASSVd-P (Malandraki et al., 2015). Для проверки работы олигонуклеотидов использовали отечественные наборы реагентов компании ООО «НПФ Синтол»: 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green, набор реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ), а также набор OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген») по инструкциям, прилагаемым к наборам. Данный формат ПЦР является информативным – детекция продуктов осуществляется непосредственно в ходе процесса амплификации, а не после нее. Дополнительно данный формат позволяет определять наличие/отсутствие вторичных структур и специфичность праймеров. Для реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов «ОТ-1» (ООО «НПФ Синтол»). Постановку ПЦР-РВ осуществляли на приборе CFX96 Bio-Rad Laboratories, Inc. (США).

Олигонуклеотиды синтезированы отечественной компанией АО «ГенТерра» и предоставлены в лиофилизированном виде. Рабочая концентрация олигонуклеотидов – 10 пмоль/мкл.

Предварительно все тестируемые олигонуклеотиды были биоинформатически проверены на возможность образования вторичных структур (шпилек, димеров), температуру плавления и специфичность посадки. Были использованы онлайн-сервисы Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2025) и Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calculator, 2025). Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей вириода рубцеватости плодов яблони была использована программа MAFFT версия 7.526 с последующей визуализацией в программе AliView версия 1.27. Анализ олигонуклеотидов проводили с помощью онлайн-сервиса National Center for Biotechnology Information Primer-BLAST (NCBI Primer-BLAST, 2025).

Synthol). All of the above isolates were used to evaluate the specificity of the analyzed primers.

RNA extraction from the isolates was performed using the Sorb-GMO-B reagent kit (Syntol, Russia). The following oligonucleotides were used for identification of ASSVd by real-time PCR: cASSVd/hASSVd (Di Serio et al., 2002), ASSVd-F91/ASSVd-R291 (Bae, 2015; Bak et al., 2017), ASSVd-F/ASSVd-R/ASSVd-P (Malandraki et al., 2015). To test the performance of the oligonucleotides, we used Russian reagent kits by Syntol: 2.5x Reaction Mixture for Real-Time PCR in the Presence of EVA

Green Dye, a Reagent Kit for PCR Combined with the Reverse Transcription Reaction (RT-PCR), and the OneTube RT-PCR SYBR Kit (Evrogen) according to the instructions included with the kits. This PCR format is informative – product detection occurs directly during the amplification process, rather than after it. Additionally, this format allows for determining the presence/absence of secondary structures and primer specificity. The OT-1 reagent kit (NPF Syntol) was used for the reverse transcription reaction. RT-PCR was performed on a CFX96 Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA).

The oligonucleotides were synthesized by the Russian company GenTerra and provided in lyophilized form. The working concentration of the oligonucleotides is 10 pmol/μl.

All tested oligonucleotides were preliminarily bioinformatically checked for the possibility of forming secondary structures (hairpins, dimers), melting temperature, and binding specificity. The online services Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2025) and Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calculator, 2025) were used. For multiple alignment of the nucleotide sequences of the apple fruit scarring viroid, MAFFT version 7.526 was used, followed by visualization in AliView version 1.27. Oligonucleotide analysis was performed using the online service National Center for Biotechnology Information Primer-BLAST (NCBI Primer-BLAST, 2025).

RESEARCH RESULTS

Bioinformatics analysis revealed that the cASSVd/hASSVd oligonucleotides can form GC-rich secondary structures (see Fig. 4). The predicted melting temperature for this primer pair was 70°C. Primer validation revealed that the hASSVd oligonucleotide is located in a region where some isolates of the target viroid exhibit polymorphisms that could interfere with primer annealing and lead to false-negative results (see Fig. 5).

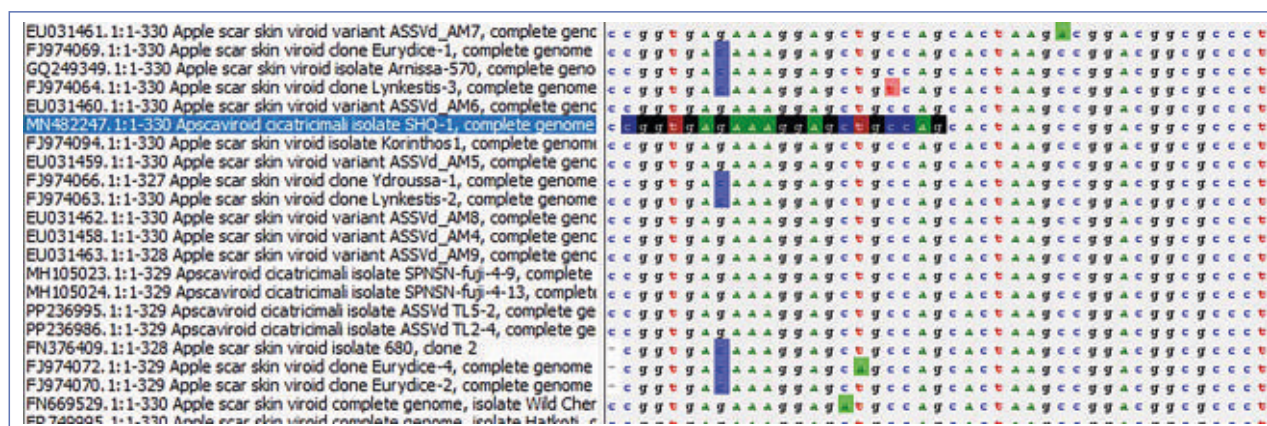


Рис. 5. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера hASSVd (фото авторов)

Fig. 5. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the hASSVd primer (photo by the authors)

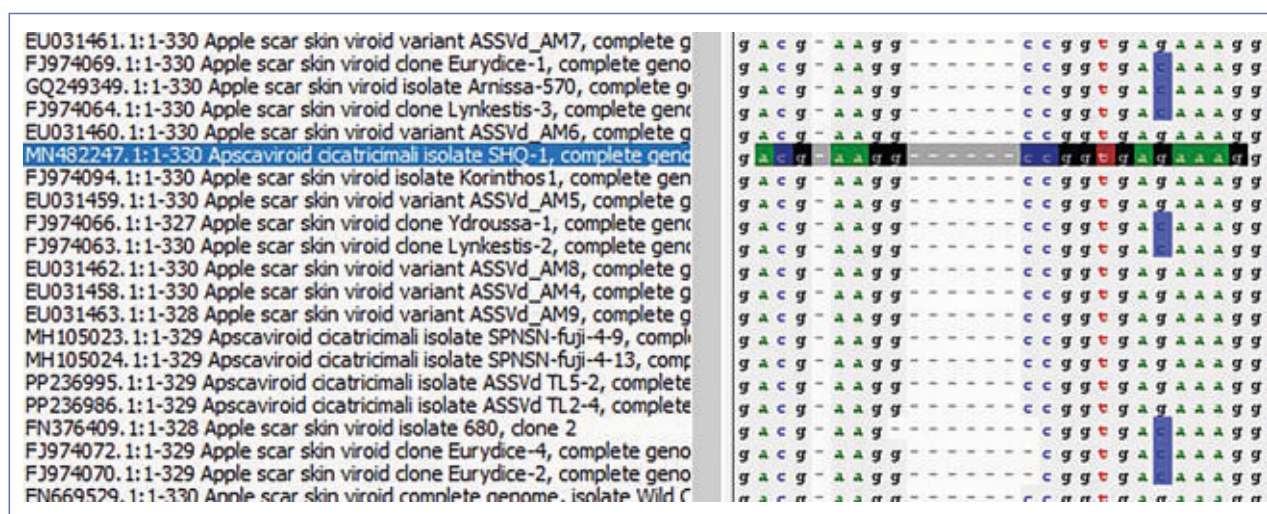


Рис. 6. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера ASSVd-F91 (фото авторов)

Fig. 6. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the ASSVd-F91 primer (photo by the authors)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты биоинформатического анализа показали, что олигонуклеотиды cASSVd/hASSVd могут образовывать GC-богатые вторичные структуры (см. рис. 4). Расчетная температура плавления для данной пары праймеров составила 70 °C. Проверка праймеров показала, что олигонуклеотид hASSVd расположен в области, где у некоторых изолятов целевого вириода присутствуют полиморфизмы, которые могут повлиять на отжиг данного праймера и привести к ложноотрицательному результату (см. рис. 5).

Анализ пары праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 показал, что она не образует вторичных структур. Температура плавления – 67 °C. Несмотря на отсутствие шпилек и димеров, данные праймеры располагаются в областях с полиморфизмами (см. рис. 6, рис. 7). Такое расположение олигонуклеотидов значительно сокращает количество потенциально детектируемых изолятов/штаммов вириода рубцеватости плодов яблони.

Последней анализируемой парой праймеров для идентификации целевого вириода были ASS-F/ASS-R с зондом ASS-P для постановки ПЦР-РВ. Данная комбинация не создает шпилек, но ASS-R

Analysis of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primer pair showed that it does not form secondary structures. Melting temperature is 67°C. Despite the absence of hairpins and dimers, these primers are located in regions with polymorphisms (see Fig. 6, Fig. 7). This arrangement of the oligonucleotides significantly reduces the number of potentially detectable ASSVd isolates/strains.

The final primer pair analyzed for target viroid identification was ASS-F/ASS-R with the ASS-P probe for real-time PCR. This combination does not produce hairpins, but ASS-R can form a dimer (see Fig. 8). It should also be noted that the probe is only 13 nucleotides long, and due to the presence of a fluorophore and quencher, the 5'- and 3'-terminal nucleotides may not be involved in annealing, which significantly reduces the specificity and sensitivity of this probe.

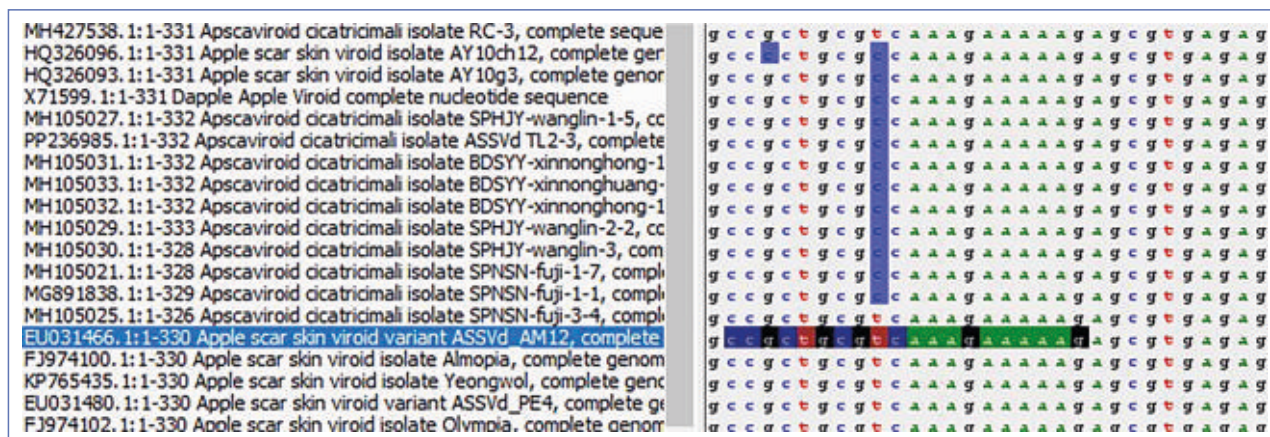


Рис. 7. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера ASSVd-R291 (фото авторов)

Fig. 7. Fragment of multiple alignment sequences of ASSVd and the landing region of the primer ASSVd-R291 (photo by the authors)

может образовывать димер (см. рис. 8). Дополнительно хочется отметить, что размер зонда всего 13 нуклеотидов, ввиду наличия у него флуорофора и гасителя, 5'- и 3'-концевые нуклеотиды могут не участвовать при отжиге, что значительно снижает специфичность и чувствительность такого зонда. Температура плавления составила 67, 66 и 65 °C соответственно. Область посадки праймеров ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P находится в наиболее консервативных регионах с небольшим количеством полиморфизмов (см. рис. 9), что увеличивает количество детектируемых изолятов/штаммов ASSVd.

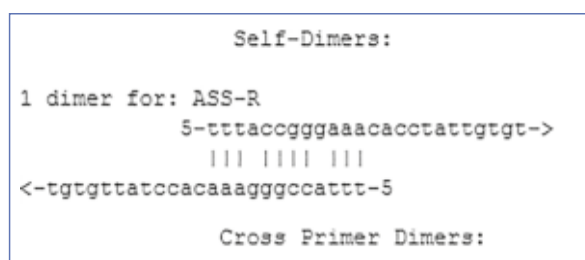


Рис. 8. Вариант вторичных структур для праймера ASS-R, интерфейс Multiple Primer Analyzer (фото авторов)

Fig. 8. Secondary structure variant for the ASS-R primer, Multiple Primer Analyzer interface (photo by the authors)

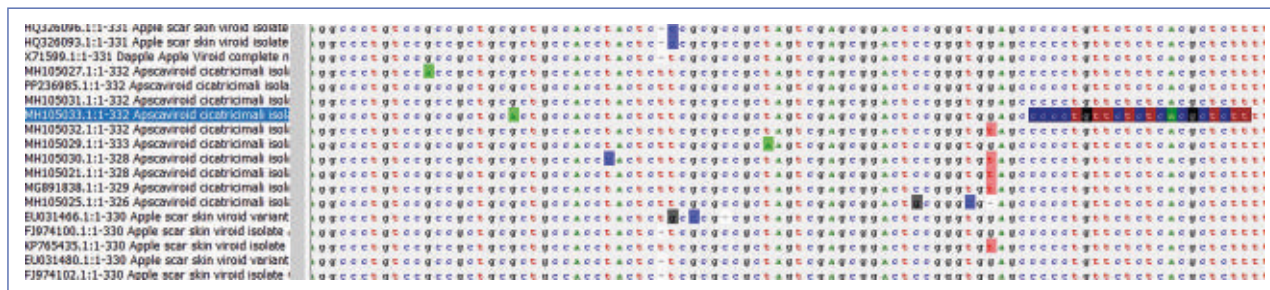


Рис. 9. Вариант вторичных структур для праймера ASS-R, интерфейс Multiple Primer Analyzer (фото авторов)

Fig. 9. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the ASS-F primer (photo by the authors)

По полученным данным биоинформатического анализа можно сделать вывод, что большинство праймеров для идентификации вириода рубцеватости плодов яблони могут образовывать большое количество вторичных структур, а расположение области посадки на полиморфизмах снижает количество детектируемых изолятов/штаммов ASSVd. Для более точного определения влияния вторичных структур на специфичность и чувствительность диагностики проведено тестирование методом ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя. Данный анализ проводился для более полного понимания особенностей работы олигонуклеотидов и для точной интерпретации полученных результатов.

Постановку ПЦР-РВ проводили на образцах как целевого изолята ASSVd, так и на близкородственных вириодах. Оценку работы олигонуклеотидов проводили по следующим критериям: отсутствие сигнала флуоресценции в отрицательном контроле, в пробах с РНК близкородственных

The melting temperatures were 67, 66, and 65°C, respectively. The binding sites of the ASS-F/ASS-R primers and the ASS-P probe are located in the most conserved regions with a small number of polymorphisms (see Fig. 9), which increases the number of ASSVd isolates/strains detected.

Based on the bioinformatics analysis data, it can be concluded that most primers for identifying ASSVd can form a large number of secondary structures, and that targeting the planting region on polymorphisms reduces the number of detected ASSVd isolates/strains. To more accurately determine the influence of secondary structures on diagnostic specificity and sensitivity, real-time PCR testing using an intercalating dye was conducted. This analysis was conducted to better understand the performance of the oligonucleotides and to accurately interpret the results.

видов, выход кинетической кривой до 38-го цикла. Анализ проводили с использованием регрессионного метода.

На рис. 10 показаны результаты тестирования пары праймеров cASSVd/hASSVd с готовой реакционной смесью в присутствии красителя EVA Green (ООО «НПФ Синтол»), которые показывают выход кривой флуоресценции как у целевого изолята ASSVd PC-1136, так и у других изолятов (PLMVd PC-1134, CEVd PV-1163, TASVd PV-0971, CLVd PV-1068, PCFVd PC-1181, CSVd PC-0735, ToCDVd PC-0916, PSTVd VIZR-07) и у отрицательного контроля. Такие данные указывают на то, что тестируемые праймеры образуют вторичные структуры и не могут использоваться при проведении диагностики, так как есть высокий риск получения ложноположительного результата. Увеличение температуры отжига может помочь избавиться от образования вторичных структур, но при этом могут быть сильные потери в чувствительности системы.

Тестирование праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 показало наличие сигнала флуоресценции у целевого вида на 31,6 цикле и почти полное отсутствие ложноположительного результата (см. рис. 11). Из всех тестируемых близкородственных виридов только у образцов PSTVd VIZR-07 и TASVd PV-0971 был замечен подъем кинетической кривой на 40-м цикле. Такой результат может быть связан с присутствием единичных копий патогена в нецелевых образцах или с неспецифичной работой праймеров.

Для оптимизации работы праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 были использованы другие наборы для проведения ПЦР, в том числе наборы для ПЦР с совмещенной реакцией обратной транскрипции. Результаты тестирования данных праймеров с набором реагентов OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген») представлены на рис. 12.

Полученные результаты показывают наличие сигнала флуоресценции почти во всех тестируемых образцах. Такой результат может быть связан с некорректной работой набора или неоптимальными условиями проведения ПЦР для данной пары праймеров в тестируемом наборе.

Тестирование праймеров ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) (ООО «НПФ Синтол»). Полученные результаты представлены на рис. 13.

Полученные результаты тестирования олигонуклеотидов ASS-F/ASS-R/ASS-P показывают наличие сигнала флуоресценции только у

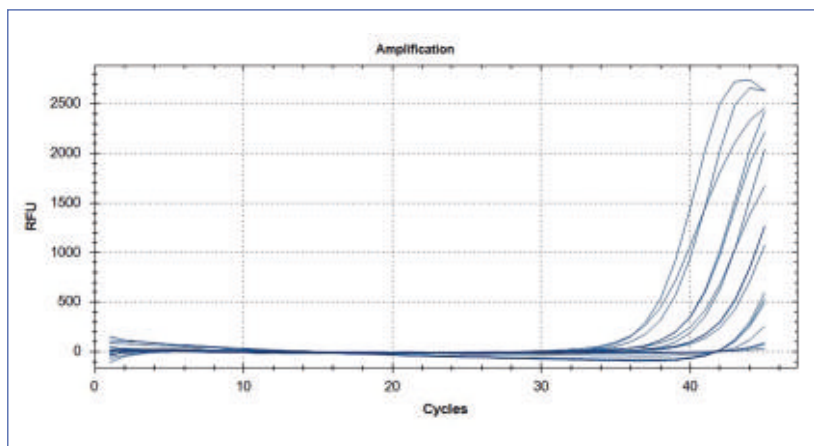


Рис. 10. Результаты анализа праймеров cASSVd/hASSVd с набором «2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя EVA Green» (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 10. Results of the analysis of cASSVd/hASSVd primers with the kit «2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of EVA Green dye» (NPF Syntol), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

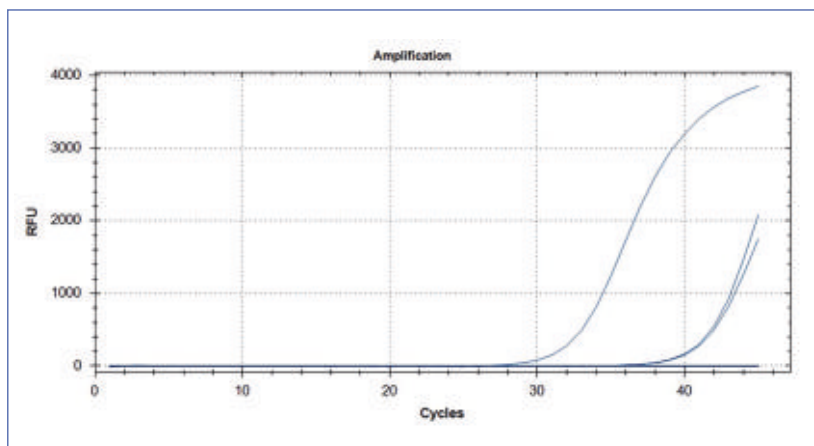


Рис. 11. Результаты анализа праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 с набором «2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ в присутствии красителя EVA Green» (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 11. Results of the analysis of primers ASSVd-F91/ASSVd-R291 with the kit «2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of EVA Green dye» (NPF Syntol), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

Real-time PCR was performed on samples of both the target ASSVd isolate and closely related viroids. Oligonucleotide performance was assessed using the following criteria: absence of a fluorescence signal in the negative control, in samples containing RNA from closely related species, and kinetic curve recovery up to cycle 38. Analysis was performed using a regression method.

Fig. 10 shows the results of testing the cASSVd/hASSVd primer pair with the prepared reaction mixture in the presence of EVA Green dye (NPF Syntol), which show the yield of the fluorescence curve for both the target isolate ASSVd PC-1136 and other isolates (PLMVd PC-1134, CEVd PV-1163, TASVd PV-0971, CLVd PV-1068, PCFVd PC-1181, CSVd PC-0735, ToCDVd PC-0916, PSTVd VIZR-07) and the

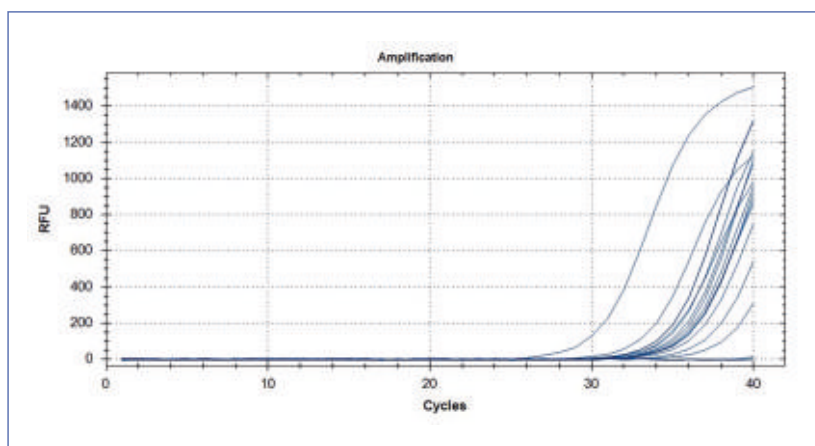


Рис. 12. Результаты анализа праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 с набором OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 12. Results of the analysis of ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers with the OneTube RT-PCR SYBR kit (Evrogen), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

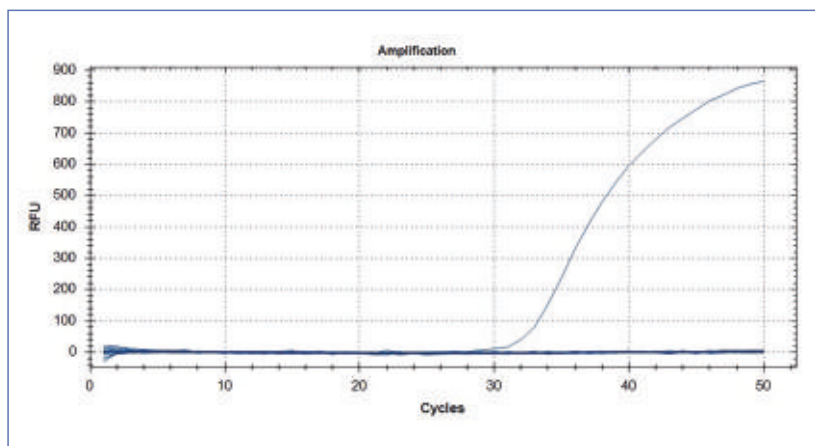


Рис. 13. Результаты анализа олигонуклеотидов ASS-F/ASS-R/ASS-P с набором реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 13. Results of the analysis of oligonucleotides ASS-F/ASS-R/ASS-P with a reagent kit for PCR combined with the reaction of reverse transcription (PCR-RT) (NPF Syntol), interface CFX96 Bio-Rad (photo by the authors)

целевого образца ASSVd PC-1136. Преимуществом использования данного набора является совмещение реакции обратной транскрипции с ПЦР-РВ, что увеличивает чувствительность диагностики. Данные праймеры показывают высокую специфичность, поэтому они будут использованы в последующих опытах для определения основных аналитических характеристик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сотрудниками научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР» в настоящее время проводятся исследования по изучению биологических особенностей вируса рубцеватости плодов яблони, способов его диагностики с дальнейшей разработкой нормативного документа для применения в лабораторной практике.

Проведенные исследования показали, что праймеры cASSVd/hASSVd способны образовывать вторичные структуры, тем самым создавая риск получения ложноположительного результата. Исходя из полученных результатов, данная

негативная информация указывает на то, что протестированные праймеры образуют вторичные структуры и не могут использоваться в диагностике, поскольку существует высокий риск получения ложноположительного результата. Повышение температуры аннелинга может помочь избежать формирования вторичных структур, но это может привести к значительным потерям в чувствительности системы.

Тестирование праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 выявило наличие флуоресцентного сигнала для целевого объекта на цикле 31,6 и почти полное отсутствие ложноположительных результатов (см. рис. 11). Из всех исследованных образцов, связанных с вирусом, только PSTVd VIZR-07 и TASVd PV-0971 показали увеличение кинетической кривой на цикле 40. Этот результат может быть связан с наличием единичных копий патогена в образцах-немишенях или с неспецифичностью праймеров.

Для оптимизации работы праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 были использованы другие наборы реагентов для ПЦР, включая наборы реагентов для ПЦР с обратной транскрипцией. Результаты тестирования праймеров с набором реагентов OneTube RT-PCR SYBR (Evrogen) представлены на рис. 12.

Полученные результаты свидетельствуют о наличии флуоресцентного сигнала в почти всех исследованных образцах. Этот результат может быть связан с неправильной работой набора реагентов или субоптимальными условиями ПЦР для данной пары праймеров.

Тестирование праймеров ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P проводилось с использованием набора реагентов для ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR) (NPF Syntol). Результаты представлены на рис. 13.

Полученные результаты тестирования олигонуклеотидов ASS-F/ASS-R/ASS-P свидетельствуют о наличии флуоресцентного сигнала только для целевого образца ASSVd PC-1136. Преимуществом использования данного набора является сочетание реакции обратной транскрипции с ПЦР, что увеличивает диагностическую чувствительность. Эти праймеры демонстрируют высокую специфичность и будут использоваться в последующих экспериментах для определения основных аналитических характеристик.

CONCLUSION

Исследователи ФГБУ «ВНИИКР» в настоящее время проводят исследование биологических характеристик ASSVd, методов его диагностики, а также последующее разработку нормативного документа для использования в лабораторной практике.

Проведенные исследования показали, что праймеры cASSVd/hASSVd способны образовывать вторичные структуры, тем самым создавая риск получения ложноположительного результата.

пара праймеров не будет использоваться в дальнейших исследованиях. При тестировании праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 отмечено, что они выявляют целевой вириод. В дальнейших исследованиях будет проводиться их апробация с другими наборами реагентов для ПЦР и дополнительной оптимизацией реакции. Олигонуклеотиды ASS-F/ASS-R/ASS-P для ПЦР-РВ также будут протестированы другими наборами реагентов отечественного производства. Для используемых праймеров в дальнейшем будут определены основные аналитические характеристики.

Финансирование. Исследования выполнены в рамках государственного задания (рег. № ЕГИСУ НИОКТР 125031103530-8).

Благодарность. Авторы выражают благодарность отделу диагностики патогенов растений ООО «Синтол» за предоставление изолята вириода для исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вириод латентной мозаики персика – опасный патоген плодовых культур / Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Лозовая Е.Н., Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В. // Фитосанитария. Карантин растений. 2021. № 2. С. 20–26.
2. Bae Y.S. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-do // Master's thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea. 2015.
3. Bak S., Seo E., Kim S.Y., Park W.H., Lee S.H. First report *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infecting peach trees in South Korea // Research in Plant Disease. 2017. T. 23. №. 1. P. 75–81.
4. Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R. Biological properties of apple scar skin viroid: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission // Plant Disease. 1999. T. 83. №. 8. P. 768–772.
5. Di Serio F., Ambrós S., Sano T., Flores R., Navarro B. Viroid diseases in pome and stone fruit trees and Koch's postulates: a critical assessment // Viruses. 2018. T. 10. №. 11. P. 612.
6. Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Ragozzino A., Flores R. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2002. P. 27–34.
7. Diener T.O. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA // Virology. 1971. T. 45. №. 2. P. 411–428.
8. Diener T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? // Advances in Virus Research. 2001. Vol. 57. P. 137–184.
9. Hadidi A., Barba M., Hong N., Hallan V. Apple scar skin viroid // Viroids and satellites. Academic press. 2017. P. 217–228.
10. Hashimoto J., Koganezawa H. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid // Nucleic Acids Research. 1987. T. 15. №. 17. P. 7045–7052.
11. Heo S., Kim H.R., Lee H.J. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid // The plant pathology journal. 2019. T. 35. №. 2. P. 164.

results. Based on these results, this primer pair will not be used in further studies. Testing of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers revealed that they detect the target viroid. Further studies will involve testing them with other PCR reagent kits and further optimization of the reaction. The ASS-F/ASS-R/ASS-R oligonucleotides for real-time PCR will also be tested with other Russian reagent kits. The main analytical characteristics of the primers used will be further determined.

Financing. The research was carried out within the framework of the State assignment (registration number EGISU NIOKTR 125031103530-8).

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Syntol Plant Pathogen Diagnostics Department for providing the viroid isolate for research.

REFERENCES

1. Prikhodko Yu.N., Zhivaeva T.S., Lozovaya E.N., Shneyder Yu.A., Karimova E.V. Peach latent mosaic viroid – dangerous pathogen of fruit crops. Plant Health and Quarantine. 2021; (2): 20-26.
2. Bae Y.S. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-do // Master's thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea. 2015.
3. Bak S., Seo E., Kim S.Y., Park W.H., Lee S.H. First report *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infecting peach trees in South Korea // Research in Plant Disease. 2017. T. 23. №. 1. P. 75–81.
4. Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R. Biological properties of apple scar skin viroid: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission // Plant Disease. 1999. T. 83. №. 8. P. 768–772.
5. Di Serio F., Ambrós S., Sano T., Flores R., Navarro B. Viroid diseases in pome and stone fruit trees and Koch's postulates: a critical assessment // Viruses. 2018. T. 10. №. 11. P. 612.
6. Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Ragozzino A., Flores R. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2002. P. 27–34.
7. Diener T.O. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA // Virology. 1971. T. 45. №. 2. P. 411–428.
8. Diener T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? // Advances in Virus Research. 2001. Vol. 57. P. 137–184.
9. Hadidi A., Barba M., Hong N., Hallan V. Apple scar skin viroid // Viroids and satellites. Academic press. 2017. P. 217–228.
10. Hashimoto J., Koganezawa H. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid // Nucleic Acids Research. 1987. T. 15. №. 17. P. 7045–7052.
11. Heo S., Kim H.R., Lee H.J. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid // The plant pathology journal. 2019. T. 35. №. 2. P. 164.

12. Hurtt S.S., Podleckis E.V. Apple scar skin viroid is not seed transmitted or transmitted at a low rate in oriental pear // *Acta Horticulturae*. 1995. № 386. P. 544–550.
13. Kaponi M., Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Viroids of the mediterranean basin // *Viruses*. 2024. T. 16. №. 4. P. 612.
14. Kaponi M.S., Sano T., Kyriakopoulou P.E. Natural infection of sweet cherry trees with apple scar skin viroid // *Journal of Plant Pathology*. 2013. P. 429–433.
15. Kim D.H., Kim H.R., Heo S., Kim S.H., Kim M.A., Shin I.S., Kim J.H., Cho K.H., Hwang J.H. Occurrence of apple scar skin viroid and relative quantity analysis using real-time RT-PCR // *Research in Plant Disease*. 2010. T. 16. №. 3. P. 247–253.
16. Kim H.R., Lee S.H., Lee D.H., Kim J.S., Park J.W. Transmission of Apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds // *The Plant Pathology Journal*. 2006. T. 22. №. 1. P. 63–67.
17. Koganezawa H. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin diseased trees // *Japanese Journal of Phytopathology*. 1985. T. 51. №. 2. P. 176–182.
18. Kumar S., Singh R.M., Ram R., Badyal J., Hallan V., Zaidi A.A., Varma A. Determination of major viral and sub viral pathogens incidence in apple orchards in Himachal Pradesh // *Indian Journal of Virology*. 2012. T. 23. №. 1. P. 75–79.
19. Kwon M.J., Hwang S.L., Lee S.J., Lee D.H., Lee J.Y. Detection and distribution of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea // *The Plant Pathology Journal*. 2002. Vol. 18(6). P. 342–344.
20. Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., Hadidi A. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region // *Journal of Plant Pathology*. 2001. Vol. 83(1). P. 51–62.
21. Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with Apple scar skin viroid in Greece // XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472. 1997. P. 617–626.
22. Lee J.H., Park J.K., Lee D.H., Uhm J.Y., Ghim S.Y., Lee J.Y. Occurrence of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) in apples cultivated in Korea // *The Plant Pathology Journal*. 2001. T. 17. №. 5. P. 300–304.
23. Li G., Li J., Zhang H., Li J., Jia L., Zhou S., Wang Y., Sun J., Tan M., Shao J. ASSVd infection inhibits the vegetative growth of apple trees by affecting leaf metabolism // *Frontiers in Plant Science*. 2023. T. 14. P. 1137630.
24. Liu F.C., Chen R.F., Chen Y.X. Apple Scar Skin Disease // *Academica Sinica Printery*; Beijing, China. 1957. P. 43.
25. Liu F.C., Wang S.Y., Tian C.F., Chen R.F. Studies on apple scar skin disease // *Annual Reports of Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science*. 1962. P. 71–79.
26. Lodh S. Elucidating the fate of Apple scar skin viroid RNA in animal cells: Diss. // *CSKHPKV, Palampur*. 2017. P. 113.
12. Hurtt S.S., Podleckis E.V. Apple scar skin viroid is not seed transmitted or transmitted at a low rate in oriental pear // *Acta Horticulturae*. 1995. № 386. P. 544–550.
13. Kaponi M., Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Viroids of the mediterranean basin // *Viruses*. 2024. T. 16. №. 4. P. 612.
14. Kaponi M.S., Sano T., Kyriakopoulou P.E. Natural infection of sweet cherry trees with apple scar skin viroid // *Journal of Plant Pathology*. 2013. P. 429–433.
15. Kim D.H., Kim H.R., Heo S., Kim S.H., Kim M.A., Shin I.S., Kim J.H., Cho K.H., Hwang J.H. Occurrence of apple scar skin viroid and relative quantity analysis using real-time RT-PCR // *Research in Plant Disease*. 2010. T. 16. №. 3. P. 247–253.
16. Kim H.R., Lee S.H., Lee D.H., Kim J.S., Park J.W. Transmission of Apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds // *The Plant Pathology Journal*. 2006. T. 22. №. 1. P. 63–67.
17. Koganezawa H. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin diseased trees // *Japanese Journal of Phytopathology*. 1985. T. 51. №. 2. P. 176–182.
18. Kumar S., Singh R.M., Ram R., Badyal J., Hallan V., Zaidi A.A., Varma A. Determination of major viral and sub viral pathogens incidence in apple orchards in Himachal Pradesh // *Indian Journal of Virology*. 2012. T. 23. №. 1. P. 75–79.
19. Kwon M.J., Hwang S.L., Lee S.J., Lee D.H., Lee J.Y. Detection and distribution of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea // *The Plant Pathology Journal*. 2002. Vol. 18(6). P. 342–344.
20. Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., Hadidi A. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region // *Journal of Plant Pathology*. 2001. Vol. 83(1). P. 51–62.
21. Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with Apple scar skin viroid in Greece // XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472. 1997. P. 617–626.
22. Lee J.H., Park J.K., Lee D.H., Uhm J.Y., Ghim S.Y., Lee J.Y. Occurrence of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) in apples cultivated in Korea // *The Plant Pathology Journal*. 2001. T. 17. №. 5. P. 300–304.
23. Li G., Li J., Zhang H., Li J., Jia L., Zhou S., Wang Y., Sun J., Tan M., Shao J. ASSVd infection inhibits the vegetative growth of apple trees by affecting leaf metabolism // *Frontiers in Plant Science*. 2023. T. 14. P. 1137630.
24. Liu F.C., Chen R.F., Chen Y.X. Apple Scar Skin Disease // *Academica Sinica Printery*; Beijing, China. 1957. P. 43.

27. Malandraki I., Varveri C., Olmos A., Vassilakos N. One-step multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas of pome fruit trees // Journal of Virological Methods. 2015. Vol. 213. 12–17.
28. Ohtsuka Y. A new diseased of apple, on the abnormality of fruit // Journal of Japan Society Horticultural Scienc (in Japanese). 1935. T. 6. P. 44–53.
29. Ohtsuka Y. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars // Journal of Japan Society Horticultural Science. 1938. T. 9. P. 282–286.
30. Shamloul A.M., Yang X., Han L., Hadidi A. Characterization of a new variant of Apple scar skin viroid associated with pear fruit crinkle disease // Journal of Plant Pathology. 2004. P. 249–256.
31. Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. Development of a rapid enzymatic cDNA amplification test for the detection of Apple Scar Skin Viroid (ASSVd) in apple trees from eastern Anatolia, Turkey // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2009. T. 42. №. 4. P. 352–360.
32. Takahashi T. Plant viroid diseases occurring in Japan // Japan Agricultural Research Quarterly. 1987. T. 21. №. 3. P. 184–191.
33. Tian M., Wei S., Bian R., Luo J., Khan H.A., Tai H., Sun L. Natural cross-kingdom spread of apple scar skin viroid from apple trees to fungi // Cells. 2022. T. 11. №. 22. P. 3686.
34. Walia Y., Dhir S., Bhadoria S., Hallan V., Zaidi A.A. Molecular characterization of Apple scar skin viroid from Himalayan wild cherry // Forest Pathology. 2012. T. 42. №. 1. P. 84–87.
35. Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A.A., Hallan V. Identification of the herbaceous host range of Apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants // Plant pathology. 2014. T. 63. №. 3. P. 684–690.
36. Walia Y., Dhir S., Zaidi A.A., Hallan V. Apple scar skin viroid naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* // RNA Biology. 2015. T. 12. №. 10. P. 1131–1138.
37. Yazarlou A., Jafarpour B., Habili N., Randles J.W. First detection and molecular characterization of new Apple scar skin viroid variants from apple and pear in Iran // Australasian Plant Disease Notes. 2012. T. 7. №. 1. P. 99–102.
38. CABI, 2025. Apple scar skin viroid (apple dimple) [Электронный ресурс]. URL: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.6086> (дата обращения 18.08.2025).
39. CABI/EPPO, 2025. Apple scar skin viroid [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/DMPD/20123367481> (дата обращения 27.07.2025).
40. EPPO Global Database, 2025. *Apescaviroid cicatricimali* [Электронный ресурс]. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/ASSVD0> (дата обращения: 27.07.2025).
41. NCBI Primer-BLAST [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 08.08.2025).
42. Oligo Calculator, 2025. Oligonucleotide Properties Calculator [Электронный ресурс]. URL: <http://oligocalc.eu/> (дата обращения: 08.08.2025).
43. Thermo Fisher Scientific Inc., 2025. Multiple
25. Liu F.C., Wang S.Y., Tian C.F., Chen R.F. Studies on apple scar skin disease // Annual Reports of Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science. 1962. P. 71–79.
26. Lodh S. Elucidating the fate of Apple scar skin viroid RNA in animal cells: Diss. // CSKHPKV, Palampur. 2017. P. 113.
27. Malandraki I., Varveri C., Olmos A., Vassilakos N. One-step multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas of pome fruit trees // Journal of Virological Methods. 2015. Vol. 213. 12–17.
28. Ohtsuka Y. A new diseased of apple, on the abnormality of fruit // Journal of Japan Society Horticultural Scienc (in Japanese). 1935. T. 6. P. 44–53.
29. Ohtsuka Y. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars // Journal of Japan Society Horticultural Science. 1938. T. 9. P. 282–286.
30. Shamloul A.M., Yang X., Han L., Hadidi A. Characterization of a new variant of Apple scar skin viroid associated with pear fruit crinkle disease // Journal of Plant Pathology. 2004. P. 249–256.
31. Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. Development of a rapid enzymatic cDNA amplification test for the detection of Apple Scar Skin Viroid (ASSVd) in apple trees from eastern Anatolia, Turkey // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2009. T. 42. №. 4. P. 352–360.
32. Takahashi T. Plant viroid diseases occurring in Japan // Japan Agricultural Research Quarterly. 1987. T. 21. №. 3. P. 184–191.
33. Tian M., Wei S., Bian R., Luo J., Khan H.A., Tai H., Sun L. Natural cross-kingdom spread of apple scar skin viroid from apple trees to fungi // Cells. 2022. T. 11. №. 22. P. 3686.
34. Walia Y., Dhir S., Bhadoria S., Hallan V., Zaidi A.A. Molecular characterization of Apple scar skin viroid from Himalayan wild cherry // Forest Pathology. 2012. T. 42. №. 1. P. 84–87.
35. Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A.A., Hallan V. Identification of the herbaceous host range of Apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants // Plant pathology. 2014. T. 63. №. 3. P. 684–690.
36. Walia Y., Dhir S., Zaidi A.A., Hallan V. Apple scar skin viroid naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* // RNA Biology. 2015. T. 12. №. 10. P. 1131–1138.
37. Yazarlou A., Jafarpour B., Habili N., Randles J.W. First detection and molecular characterization of new Apple scar skin viroid variants from apple and pear in Iran // Australasian Plant Disease Notes. 2012. T. 7. №. 1. P. 99–102.
38. CABI, 2025. Apple scar skin viroid (apple dimple) [Electronic resource]. URL: <https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.6086> (last accessed 18.08.2025).
39. CABI/EPPO, 2025. Apple scar skin viroid [Electronic resource]. URL: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/DMPD/20123367481> (last accessed 27.07.2025).

Primer Analyzer [Электронный ресурс]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html> (дата обращения: 08.08.2025).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Башкирова Ида Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;

ORCID: 0000-0001-9014-4179,

e-mail: bashkirova@mail.ru

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;

ORCID: 0009-0004-9176-407X,

e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; доцент кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»;

ORCID: 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;

ORCID: 0000-0001-8612-5127,

e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;

ORCID: 0009-0008-8312-2666,

e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Селявкин Сергей Николаевич, младший научный сотрудник Воронежского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Воронежская обл., Россия;

ORCID: 0000-0001-7647-5799,

e-mail: selyavkin91@mail.ru

40. EPPO Global Database, 2025. *Apscaviroid cicatricimali* [Electronic resource]. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/ASSVD0> (last accessed: 27.07.2025).

41. NCBI Primer-BLAST [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (last accessed: 08.08.2025).

42. Oligo Calculator, 2025. Oligonucleotide Properties Calculator [Electronic resource]. URL: <http://oligocalc.eu/> (last accessed: 08.08.2025).

43. Thermo Fisher Scientific Inc., 2025. Multiple Primer Analyzer [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html> (last accessed: 08.08.2025).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ida Bashkirova, PhD in Biology, Researcher, Research and Methodology Department of Virology, Leading Researcher, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;

ORCID ID: 0000-0001-9014-4179,

e-mail: bashkirova@mail.ru

Yuri Prihodko, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;

ORCID ID: 0009-0004-9176-407X,

e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology Department of Virology, Leading Researcher, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Associate Professor of Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;

ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Evgenya Lozovaya, Researcher, Postgraduate Study Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;

ORCID ID: 0000-0001-8612-5127,

e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Tatyana Zhivaeva, Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;

ORCID ID: 0009-0008-8312-2666,

e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Sergey Selyavkin, Junior Researcher, Voronezh Branch of FGBU “VNIKR”, Voronezh, Voronezh Oblast, Russia;

ORCID ID: 0000-0001-7647-5799,

e-mail: selyavkin91@mail.ru